

Phagenähnliche RNA-Polymerasen: Regulation und Rolle in der plastidären Transkription in *Arabidopsis thaliana*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Monika Swiatecka-Hagenbruch

geboren am 20.10.1976 in Gdansk

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat., habil. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner

2. Prof. Dr. Annegret Wilde

3. Prof. Dr. Bernhard Grimm

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2009

Meinen Eltern

Moim Rodzicom

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	IV
Abkürzungsverzeichnis und Genbezeichnungen	V
I Einleitung	1
I.1 Genexpression in Plastiden	2
I.1.1 Das plastidäre Genom	2
I.1.2 Plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase des Eubakterientyps (PEP)	3
I.1.3 Kernkodierte plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase (NEP)	4
I.1.3.1 Verbreitung von Genen organellärer Phagentyp-RNA-Polymerasen	5
I.1.4 Plastidäre Promotorstrukturen	7
I.1.4.1 Promotoren der plastidenkodierten plastidären RNA-Polymerase (PEP)	8
I.1.4.2 Promotoren der kernkodierten plastidären RNA-Polymerase (NEP)	9
I.1.4.3 Plastidäre tRNA-Gene und ihre Promotoren	11
I.1.5 Wirkung von Inhibitoren auf die plastidäre Biogenese	12
I.1.6 Die Transkription plastidärer Gene	13
I.1.7 Regulation plastidärer Genexpression	14
I.2 Zielstellung der Arbeit	16
II Material und Methoden	18
II.1 Material	18
II.1.1 Pflanzenmaterial	18
II.1.2 Bakterienstämme	18
II.1.3 Plasmide	19
II.1.4 Anbieter	19
II.1.5 Computerprogramme	20
II.2 Methoden	21
II.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren	21
II.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
II.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA	21
II.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA von <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
II.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren	21
II.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	21
II.2.3.1 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese von DNA	21
II.2.3.2 Analytische Agarosegelelektrophorese von RNA	22
II.2.3.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA	22
II.2.4 Transfer von Nukleinsäuren	23
II.2.4.1 <i>Northern</i> -Transfer	23
II.2.4.2 <i>Dot Blot</i> -Transfer	23
II.2.5 cDNA-Synthese	23
II.2.6 Amplifikation von DNA mittels PCR	23
II.2.7 Quantitative <i>real-time</i> -PCR	23
II.2.7.1 Reverse Transkription	24
II.2.7.2 <i>real-time</i> -PCR	24
II.2.8 Klonierung und Sequenzierung	25
II.2.8.1 Transformation von <i>E. coli</i>	25
II.2.8.2 Sequenzierung von DNA	25
II.2.9 <i>Primer Extension</i> Analyse	26
II.2.9.1 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	26
II.2.9.2 <i>Primer Extension</i> Reaktion	27
II.2.9.3 Radioaktive Sequenzierung von DNA	28
II.2.10 5'- <i>RACE</i> Analyse von RNA	28
II.2.11 <i>Northern Blot</i> Analyse	32
II.2.11.1 Herstellung und Markierung von DNA-Sonden	32

II.2.11.2	Detektion von RNA	32
II.2.12	Analyse der <i>run-on</i> Transkription	33
II.2.12.1	Isolation von Plastiden	33
II.2.12.2	<i>Run-on</i> Transkription	34
II.2.12.3	Hybridisierung und Detektion der <i>run-on</i> Transkripte	34
II.2.13	Nachweis von Reportergenen	37
II.2.13.1	Histochemischer <i>GUS</i> -Nachweis	37
II.2.14	Durchflusszytometrie der chromosomalen Ploidie	37
III	Ergebnisse	38
III.1	Plastidäre Transkription in Arabidopsis	38
III.1.1	Herstellung PEP-defizienter Arabidopsis-Pflanzen	38
III.1.2	Analyse plastidärer Promotoren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
III.1.2.1	Identifizierung plastidärer Promotoren mittels 5'- <i>RACE</i>	39
III.1.2.2	Analyse der plastidären Promotoren mittels <i>Primer Extension</i> Assays	49
III.1.3	Analyse der Transkriptakkumulation im chlorophylldefizienten Gewebe	50
III.1.4	Analyse der Transkriptionsaktivität in weißen Plastiden	53
III.1.5	Charakterisierung von Transkriptionsstartpunkten plastidärer tRNA-Gene	56
III.1.6	Bestimmung der Plastomkopienzahl im chlorophylldefizienten Gewebe	62
III.2	Analyse der Transkriptionsregulation	64
III.2.1	Analyse der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen	64
III.2.1.1	Regulation der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen durch Licht	65
III.2.1.2	Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen unter Salzstress	70
III.2.1.3	Wirkung von Spectinomycin auf die Expression von <i>RpoTp</i> und <i>RpoTmp</i>	71
III.2.2	Regulation der plastidären Transkription durch Licht	72
III.2.3	Die Rollen der <i>RpoTp</i> und <i>RpoTmp</i> in der plastidären Transkription	80
IV	Diskussion	88
IV.1	Hohe Transkriptionsaktivität in weißen Plastiden von Arabidopsis trotz fehlender PEP-Aktivität	88
IV.1.1	Transkriptakkumulation im chlorophylldefizienten Gewebe von Arabidopsis	88
	Transkriptakkumulation der <i>RpoT</i> -Gene im weißen Gewebe	88
	Transkriptakkumulation plastidärer und mitochondrialer Gene	91
IV.1.2	Transkriptionsaktivität in weißen Plastiden	93
IV.1.3	Analyse des plastidären DNA-Gehaltes in Arabidopsis	96
IV.2	Nutzungsvielfalt plastidärer Promotoren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
IV.2.1	Identifizierung von Initiationsstellen der Transkription	98
	Promotoren plastidärer tRNA-Gene	100
	Multiple Promotoren sind in Chloroplasten von Arabidopsis weit verbreitet	103
	Eine DNA-Sequenz dient verschiedenen RNA-Polymerasen zur Transkriptionsinitiation	105
IV.2.2	Nutzungsvielfalt plastidärer Promotoren	107
IV.3	Regulation der Transkription	109
IV.3.1	Regulation der Genexpression von <i>RpoTmp</i> und <i>RpoTp</i> sowie ihrer Zielgene	109
	Licht induziert den gewebsspezifischen Wechsel der Expression von <i>RpoTmp</i>	109
	Wirkung von Salzstress auf die Expression von <i>RpoTmp</i> und <i>RpoTp</i>	113
	Verstärkte Expression von <i>RpoTmp</i> und <i>RpoTp</i> im chlorophylldefizienten Gewebe	114
	Licht induziert die Expression an PEP- und ausgewählten Typ-I NEP-Promotoren	115
IV.3.2	<i>RpoTp</i> kann durch <i>RpoTmp</i> ersetzt werden	118
V	Literatur	123
	Publikationen und Konferenzbeiträge	148
	Danksagung	149
	Erklärung	150

Zusammenfassung

Plastidäre Gene höherer Pflanzen werden von mindestens zwei unterschiedlichen RNA-Polymerasen transkribiert. Neben der plastidenkodierten RNA-Polymerase des Eubakterientyps PEP ist eine kernkodierte NEP-Transkriptionsaktivität an der Transkription des plastidären Genoms beteiligt, die in der dikotylen Landpflanze *Arabidopsis thaliana* auf zwei Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp zurückgeht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription plastidärer Gene durch die NEP-Transkriptionsaktivität in *Arabidopsis* untersucht. Hierzu wurden zunächst Promotoren von 24 Genen und Operons im Plastom von *Arabidopsis* charakterisiert. Die Verwendung spectinomycinbehandelter, chlorophylldefizienter *Arabidopsis*-Pflanzen mit fehlender PEP-Aktivität erlaubte erstmals eine Unterscheidung zwischen NEP- und PEP-Promotoren. Obwohl für einige Gene einzelne Promotoren lokalisiert wurden, scheint die Transkription der meisten plastidären Gene und Operons an multiplen Promotoren stattzufinden. Der Vergleich plastidärer Promotoren von Tabak und *Arabidopsis* zeigte eine hohe Vielfältigkeit der Promotornutzung in beiden Pflanzen, welche eine speziesspezifische Kontrollmöglichkeit der plastidären Genexpression darstellt. Eine detaillierte Untersuchung des chlorophylldefizienten Gewebes auf RNA- und DNA-Ebene hat nicht nur einen starken negativen Effekt der Chlorophylldefizienz auf die plastidäre Biogenese, sondern auch ihre Wirkung auf die Expression mitochondrialer und kernkodierter Gene gezeigt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der plastidären Biogenese, ihre Einbindung in die Entwicklung der Pflanzenzelle und zeigen die Komplexität der Prozesse, welche für die Regulation der organellären Genexpression verantwortlich sind. Dabei spielen die Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp eine zentrale Rolle. Die Genexpression beider Enzyme ist entwicklungs- und gewebsspezifisch. In dieser Arbeit haben Analysen von *Arabidopsis*-Pflanzen mit integrierten *PRpoTmp::GUS*-Fusionskonstrukten erstmalig einen durch Licht induzierten Wechsel in der gewebsspezifischen Expression der RpoTmp gezeigt. Dabei scheint die RpoTmp vornehmlich für die Transkription plastidärer Gene im nicht-grünen Gewebe verantwortlich zu sein, während die RpoTp im älteren grünen Gewebe aktiv ist. Zusätzlich haben Untersuchungen der Transkriptionsinitiation plastidärer Promotoren gezeigt, dass Licht nicht nur die Transkription an PEP-Promotoren, sondern auch an Typ-I NEP-Promotoren mit dem YRTA-Konsensusmotiv aktiviert.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Nutzung von NEP- und PEP-Promotoren in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen mit verminderter und fehlender RpoTp-Aktivität untersucht. Geringere RpoTp-Aktivität und fehlende funktionelle RpoTp führen zu verringerten Mengen von Transkript-5'-Enden, welche an Typ-I NEP-Promotoren mit dem YRTA-Konsensusmotiv initiiert werden. Während der starke Typ-I NEP-Promotor des essentiellen *ycfI* Gens in jungen Mutantenkeimlingen ohne funktionelle RpoTp nicht genutzt wurde, zeigten die meisten anderen Typ-I NEP-Promotoren eine geringere Aktivität als im Wildtyp. Im Gegensatz dazu war die Nutzung der sog. *non-consensus* Promotoren des *clpP* Gens (Typ-II NEP-Promotor) und des *rrn*-Operons (Pc-Promotor) nicht negativ betroffen und sogar verstärkt durch die fehlende RpoTp-Aktivität. Das zeigt nicht nur die Wichtigkeit von RpoTp für die plastidäre Transkription, sondern auch eine Beteiligung einer anderen Phagentyp-RNA-Polymerase (RpoTmp) an der Transkription plastidärer Gene von Typ-I NEP-Promotoren. RpoTp und RpoTmp sind somit gemeinsam ein essentieller Teil der NEP-Transkriptionsaktivität sowohl mit überlappender, als auch mit spezifischer Rolle in der Transkription plastidärer Gene.

Summary

Plastid genes of higher plants are transcribed at least by two different RNA polymerases. Additional to the eubacterial-type plastid-encoded plastid RNA polymerase PEP a second nuclear-encoded transcription activity NEP is involved in transcription of the plastid genome, which is represented by two phage-type RNA polymerases RpoTp and RpoTmp in the dicot land plant *Arabidopsis thaliana*.

In this study the transcription of plastid genes by the transcription activity NEP has been analysed in *Arabidopsis*. To this end, promoters of 24 selected genes and operons in the plastome of *Arabidopsis* were determined. For the first time it was possible to distinguish between NEP and PEP promoters in *Arabidopsis* plastids by using spectinomycin-treated, chlorophyll-deficient *Arabidopsis* plants lacking PEP activity. Although genes exist, which are transcribed from single promoters, the transcription of plastid genes and operons by multiple promoters seems to be a common feature. Comparison of plastid promoters from tobacco and *Arabidopsis* revealed a high diversity in individual promoter usage in both plants suggesting that there are species-specific solutions for attaining control over gene expression in plastids. Detailed analysis of chlorophyll-deficient tissue at the level of RNA and DNA did not only show that the biogenesis of plastids is negatively affected by chlorophyll-deficiency, but also revealed its effect on the expression of mitochondrial and nuclear genes. These results underline the importance of plastid biogenesis and its participation in the development of plant cells. Furthermore, they show the complexity of processes responsible for the organellar gene expression. In this context, the phage-type RNA polymerases RpoTp and RpoTmp play a key role. Their gene expression is development- and tissue-specific. Using *Arabidopsis* plants with integrated *PRpoTmp::GUS* fusion constructs the present study revealed for the first time light induced changes in the tissue-specific expression of RpoTmp. Furthermore, RpoTmp seems to be responsible for the transcription of plastid genes in non-green tissue, whereas RpoTp is active in green and older tissue. In addition, analysis of transcription initiation sites of plastidial promoters showed, that light does not only activate transcription from PEP promoters, but also from type-I NEP promoters with the YRTA consensus motif.

For the first time the usage of NEP and PEP promoters has been determined in transgenic *Arabidopsis* plants with reduced and lacking RpoTp activity. Lowered activity of RpoTp as well as lacking functional RpoTp lead to reduced levels of transcript 5'-ends initiated from type-I NEP promoters with a YRTA consensus motif. While the strong type-I NEP promoter that drives transcription of the essential *ycfI* gene was not transcribed in young seedlings of the *Arabidopsis* mutant without functional RpoTp, most of the other type-I NEP promoters were less active than in the wild type. On the other hand, usage of the non-consensus-type NEP promoter of the *clpP* gene (type-II NEP promoter) and the *rrn* operon (Pc promoter) was not affected but even enhanced by the lack of the RpoTp activity. This shows not only the importance of RpoTp for plastidial transcription, but indicates also the participation of another phage-type RNA polymerase (RpoTmp) in the transcription of plastid genes from type-I NEP promoters. Both RpoTp and RpoTmp are essential parts of the NEP transcription activity and play overlapping as well as specific roles in the transcription of plastid genes.

Abkürzungsverzeichnis und Genbezeichnungen

Abb.	Abbildung
A. bidest	bidestilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
A, T, G, C	Bausteine der DNA: Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Ploidiezahl
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CDS	kodierende Sequenz
Chr.	Chromosom
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
cp	Chloroplast(en)
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e) dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (Protein der Qualle <i>Aequorea victoria</i> , das bei Anregung mit blauem (bei 475 nm) und ultraviolettem Licht (bei 396 nm) grün bei derselben Wellenlänge von 508 nm fluoresziert)
<i>GUS</i>	Gen für β -Glukuronidase aus <i>Escherichia coli</i>
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase (= 1000 Basenpaar)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
Lsg.	Lösung
mA	Milliampere
min	Minute
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
n	Anzahl der Zellkerne
NBCI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (USA)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleosidtriphosphat(e) ATP, CTP, GTP, TTP
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>pat</i>	Gen für die Phosphotransacetyltransferase aus <i>S. hygroscopicus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
Primer	Oligonukleotid
PS I	Photosystem I

PS II	Photosystem II
pt	plastidär
<i>RACE</i>	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> (eine PCR-Anwendung)
<i>RiboLockTM</i>	Ribonuklease-Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde (s)
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>Tobacco Acid Pyrophosphatase</i>
<i>Taq</i> Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	NNN'N' Tetramethyl-ethylendiamin
<i>Template</i>	Vorlage, Matrice
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit(en)
UE	Untereinheit(en)
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen/Volumen)
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht/Volumen)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Glukuronid
Zk	Zellkern

Genbezeichnungen

<i>accD</i>	Gen für die β -Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase
<i>atp6-1</i>	Gen für die Untereinheit VI der mitochondrialen ATPase
<i>atpA</i>	Gen für die CF ₁ ATPase-Komplex α -Untereinheit
<i>atpB</i>	Gen für die CF ₁ ATPase-Komplex β -Untereinheit
<i>atpF</i>	Gen für die CF ₁ ATPase-Komplex F-Untereinheit
<i>atpI</i>	Gen für die CF ₀ ATPase-Komplex α -Untereinheit
<i>CHLA-BBP2</i>	Gen für das Chlorophyll-a/b-Bindeprotein 2
<i>clpP</i>	Gen für die proteolytische Untereinheit der ATP-abhängigen Clp-Protease
<i>cox1</i>	Gen für die Untereinheit I der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase
<i>cox2</i>	Gen für die Untereinheit II der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase
<i>CSD1</i>	Gen für die Kupfer/Zink Superoxidase-Dismutase
<i>CPN60</i>	Gen für ein an der Faltung der RuBisCo involviertes molekulares Chaperon
<i>LHA2</i>	Gen für ein Protein des Lichtsammelantennenkomplexes des PS I
<i>matK</i>	Gen für die Maturase K
<i>ndhC</i>	Gen für die Untereinheit III des NADH-Dehydrogenase
<i>petB</i>	Gen für die β -Untereinheit des Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplexes
<i>petD</i>	Gen für die Untereinheit IV des Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplexes
<i>petN (ycf6)</i>	Gen für die Untereinheit VIII des Cytochrom <i>b₆f</i> -Komplexes
<i>psaA</i>	Gen für das P700 Chlorophyll a A2 Apoprotein des PS I
<i>psaB</i>	Gen für das P700 Chlorophyll a A1 Apoprotein des PS I
<i>psaJ</i>	Gen für die J-Untereinheit des PS I
<i>psbA</i>	Gen für das D1-Protein des PS II

<i>psbB</i>	Gen für das P680 Chlorophyll A Apoprotein des PS II
<i>psbD</i>	Gen für das D2-Protein des PS II
<i>psbF</i>	Gen für das Protein VI des PS II
<i>psbI</i>	Gen für das Protein I des PS II
<i>psbT</i>	Gen für das Protein T des PS II
<i>rbcL</i>	Gen für die große Untereinheit der RuBisCO
<i>RBCS</i>	Gen für die kleine Untereinheit der RuBisCO
<i>rpl23</i>	Gen für das ribosomale Protein L23
<i>rpl33</i>	Gen für das ribosomale Protein L33
<i>rpoA</i>	Gen für die α -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rpoB</i>	Gen für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rpoC1</i>	Gen für die β' -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>rpoC2</i>	Gen für die β'' -Untereinheit der RNA-Polymerase
<i>RpoTm</i>	Gen für die mitochondriale Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTm
<i>RpoTmp</i>	Gen für die mitochondriale und plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTmp
<i>RpoTp</i>	Gen für die plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase RpoTp
<i>rps2</i>	Gen für das ribosomale Protein S2
<i>rps4</i>	Gen für das ribosomale Protein S4
<i>rps8</i>	Gen für das ribosomale Protein S8
<i>rps15</i>	Gen für das ribosomale Protein S15
<i>rps16</i>	Gen für das ribosomale Protein S16
<i>rps18</i>	Gen für das ribosomale Protein S18
<i>rrn16</i>	Gen für die ribosomale RNA 16S
<i>RRN18</i>	Gen für die ribosomale RNA 18S
<i>rrn23</i>	Gen für die ribosomale RNA 23S
<i>rrn4,5</i>	Gen für die ribosomale RNA 4,5S
<i>rrn5</i>	Gen für die ribosomale RNA 5S
<i>SSADH</i>	Gen für die mitochondriale Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
<i>tRNA-Cys</i>	Gen für die mitochondriale tRNA ^{Cys}
<i>tRNA-Tyr</i>	Gen für die mitochondriale tRNA ^{Tyr}
<i>trnA</i>	Gen für die tRNA ^{Ala}
<i>trnC</i>	Gen für die tRNA ^{Cys}
<i>trnD</i>	Gen für die tRNA ^{Asp}
<i>trnE</i>	Gen für die tRNA ^{Glu}
<i>trnF</i>	Gen für die tRNA ^{Phe}
<i>trnFM</i>	Gen für die tRNA ^{fMet}
<i>trnG</i>	Gen für die tRNA ^{Gly}
<i>trnH</i>	Gen für die tRNA ^{His}
<i>trnI</i>	Gen für die tRNA ^{Ile}
<i>trnK</i>	Gen für die tRNA ^{Lys}
<i>trnL</i>	Gen für die tRNA ^{Leu}
<i>trnM</i>	Gen für die tRNA ^{Met}
<i>trnN</i>	Gen für die tRNA ^{Asn}
<i>trnP</i>	Gen für die tRNA ^{Pro}
<i>trnQ</i>	Gen für die tRNA ^{Gln}
<i>trnR</i>	Gen für die tRNA ^{Arg}
<i>trnS</i>	Gen für die tRNA ^{Ser}
<i>trnT</i>	Gen für die tRNA ^{Thr}
<i>trnV</i>	Gen für die tRNA ^{Val}
<i>trnW</i>	Gen für die tRNA ^{Trp}
<i>trnY</i>	Gen für die tRNA ^{Tyr}
<i>TUA</i>	Gen für das Protein Tubulin
<i>UBQ</i>	Gen für das Protein Ubiquitin
<i>ycf1</i>	plastidäres offenes Leseraster 1 (<i>hypothetical chloroplast open reading frame 1</i>)
<i>ycf2</i>	plastidäres offenes Leseraster 2 (<i>hypothetical chloroplast open reading frame 2</i>)
<i>ycf4</i>	plastidäres offenes Leseraster 4 (<i>hypothetical chloroplast open reading frame 4</i>)

I Einleitung

Chloroplasten sind Orte der Photosynthese und haben aus diesem Grund eine zentrale Funktion im Metabolismus der Pflanzenzelle (Gray, 1993; López-Juez und Pyke, 2005). Unter Freisetzung des für höhere Organismen lebensnotwendigen atmosphärischen Sauerstoffs bauen sie mit Hilfe der Sonnenenergie und Kohlendioxid organische Kohlenwasserstoffe auf und liefern somit heterotrophen Organismen Energiequellen. Zusammen mit Mitochondrien sind Chloroplasten höherer Pflanzen zelluläre Organellen, die sich aus frei lebenden Cyanobakterien (Delwiche et al., 1995) bzw. Purpurbakterien (Yang et al., 1985) entwickelt haben. Die photosynthetisierenden Cyanobakterien wurden im Verlauf der Endosymbiose von einer eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen, die bereits einen mitochondrialen Vorläufer beinhaltete (Gray, 1992; McFadden, 2001). Während der gemeinsamen Evolution kam es zu einer drastischen Reduktion der Genomkapazität der beiden Organellen. Der überwiegende Teil der ursprünglichen genetischen Information der organellären Genome wurde in das Kerngenom transferiert (Adams et al., 2000; Martin und Herrmann, 1998). Aus diesem Grund ist nur noch ein geringer Teil der organellenspezifischen Proteine im Chloroplasten- (Plastom) bzw. im Mitochondriengenom (Chondrom) kodiert. So kodieren die im Plastom lokalisierten Gene ca. 10 - 20 % der benötigten plastidären Proteine, hauptsächlich mit Funktionen in der Photosynthese und der Genexpression (Martin, 2003). Beispiele dafür sind die *rpo*-Gene, welche Homologe der *core*-Untereinheiten der eubakteriellen RNA-Polymerase kodieren, die vervollständigt durch kernkodierte σ -Faktoren die plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase bilden (Liere und Börner, 2007; PEP; s. Kap. I.1.2; Shiina et al., 2005). Der Großteil der plastidären Proteine ist hingegen im Zellkern kodiert und wird nach der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen in die Plastiden importiert (Heins und Soll, 1998; Herrmann et al., 1992). Zu ihnen gehören häufig Bestandteile von Multiproteinkomplexen, z. B. der ClpP-Protease, der RuBisCo oder der Ribosomen. In mehrzelligen Organismen benötigt die koordinierte Biosynthese des photosynthetischen Apparates und der Transkriptions- und Translationsmaschinerie ein enges, entwicklungs- und gewebsabhängiges Zusammenspiel in der Genexpression der getragenden Kompartimente (Binder et al., 1996; Brown et al., 2001; Link, 1996). Neben den Chloroplasten gibt es weitere morphologisch unterschiedliche Plastidenformen, welche, je nach Spezialisierungszustand der Zelle, verschiedene Ansprüche an die Umsetzung der plastidären und der nukleären Genexpression stellen (Gamble und Mullet, 1989; Isono et al.,

1997). Zusätzlich muss in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen, wie z. B. Licht, die Expression von Photosynthesegenen sowohl in Plastiden, als auch im Zellkern abgestimmt werden (Sasaki et al., 1985).

I.1 Genexpression in Plastiden

I.1.1 Das plastidäre Genom

Die vollständige Nukleotidsequenz des plastidären Genoms wurde bisher für eine Reihe unterschiedlicher Pflanzen veröffentlicht (zur Übersicht s. Jansen et al., 2005). Die hoch konservierten, ringförmigen, ca. 120 - 160 kb großen plastidären Chromosomen der meisten bisher untersuchten höheren Pflanzen liegen polyplloid, je nach Plastidentyp, mit ca. 5 bis 10.000 Kopien pro Zelle vor (Palmer, 1991; Sugiura, 1995). Charakteristisch für das plastidäre Genom sind zwei ausgedehnte invertierte Repetitionen (Abb. 1; *inverted repeats*, IR_A und IR_B). Diese gegenläufigen Sequenzabfolgen trennen zwei Einzelkopiebereiche voneinander (*large single copy region* und *small single copy region*, LSC und SSC).

Das Plastom höherer Pflanzen beinhaltet ca. 120 Gene für Komponenten der Photosynthese (Gene für Komponenten der PS I und II, des Elektronentransportes sowie der ATP-Synthase) und der Genexpression (Gene tRNAs, rRNAs, ribosomale Proteine sowie für die RNA-Polymerase). Dabei sind die Gene für Funktionen in der plastidären Translationsmaschinerie grundlegend für die Pflanzenentwicklung. Das Fehlen der Proteinbiosynthese in Plastiden ist embryonal in Tabak und Arabidopsis (Ahlert et al., 2003; Legen et al., 2007; Rogalski et al., 2006). Im Gegensatz dazu gestattet das Fehlen der Komponenten der plastidenkodierten plastidären RNA-Polymerase PEP (s. Kap. I.1.2) heterotrophes Wachstum von Tabakpflanzen trotz des Albino-Phenotyps und geminderter Photosynthese (Allison et al., 1996; Krause et al., 2000).

Neben Genen mit bekannten Funktionen trägt das Plastom auch einige offene Leseraster (*open reading frame*, ORF sowie *hypothetical chloroplast reading frame*, *ycf*). Die Identifizierung der Funktionen ihrer Genprodukte steht bisher noch aus (Sugiura, 1992). Nichtkodierende Sequenzen machen nur einen kleinen Teil des plastidären Gesamtgenoms aus. Obwohl die dichte Abfolge der einzelnen Gene nur kurze intergenische Bereiche verursacht (Shinozaki et al., 1986), sind diese nichtkodierenden Sequenzen von großer Wichtigkeit für die Regulation der plastidären Genexpression. In diesen Bereichen befinden

sich vor allem Promotoren für die Transkription (Allison, 2000) sowie Elemente, die Einfluss auf die Transkriptstabilität haben können (Monde et al., 2000).

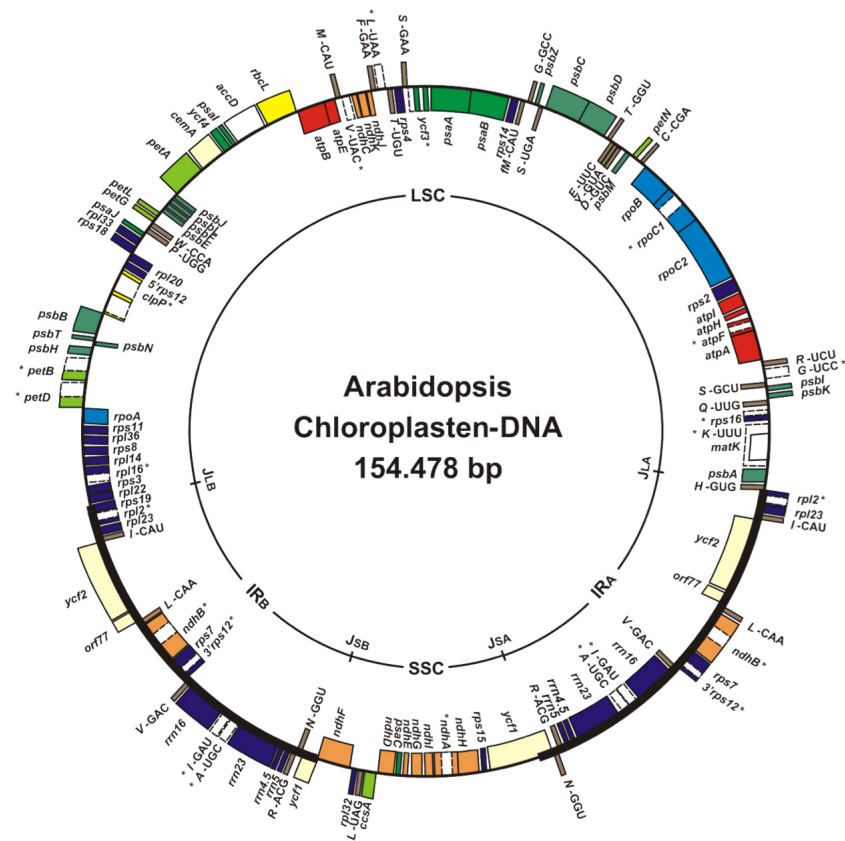


Abb. 1: Organisation des Chloroplasten-Genoms von *Arabidopsis thaliana*. Das 154.478 bp große zirkuläre Genom ist in zwei identische, gegenläufige Sequenzabfolgen (*inverted repeats*, IR_A und IR_B, fett gezeichnete Randbereiche) von 26.264 bp Länge organisiert, die durch einen kleinen (SSC, 17.780 bp) und einen großen (LSC, 84.170 bp) Einzelkopiebereich voneinander getrennt sind. Das Plastom von *Arabidopsis* beinhaltet ca. 120 Gene, die für 4 ribosomale RNAs, 30 tRNAs (37 tRNA-Gene) und 87 proteinkodierende Gene, die für Transkription, Translation und die Funktion der Plastiden wie die Photosynthese benötigt werden (Sato et al., 1999; Sugita und Sugiura, 1996). Die Gene und offene Leseraster sind entsprechend ihrer biologischen Funktion durch Boxen unterschiedlicher Farbe beiderseits des äußeren Ringes gekennzeichnet. Die Gene außerhalb des Ringes werden von rechts nach links transkribiert, die Gene innerhalb des Ringes dagegen von links nach rechts. Gene mit Intronen sind durch einen Stern gekennzeichnet, dabei ist die Position und die Länge der Intronen gestrichelt dargestellt. Nach Sato *et al.*, 1999.

I.1.2 Plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase des Eubakterientyps (PEP)

Die RNA-Polymerase von *Escherichia coli* besteht aus einem *core*-Enzym ($\alpha_2\beta\beta'$) mit katalytischer Aktivität der RNA-Synthese und benötigt für die Promotorerkennung und eine korrekte Initiation der Transkription einen austauschbaren σ -Faktor (Ishihama, 2000). Das plastidäre Genom aller bisher untersuchten nicht-parasitären Pflanzen und Algen beinhaltet

vier *rpo*-Gene (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*), die Homologe zu Proteinen einzelner Untereinheiten (UE) der eubakteriellen RNA-Polymerase kodieren (Übersicht s. Howe, 1996; Liere und Börner, 2007). Die Organisation der *rpo*-Gene ist zwischen Bakterien und Plastiden konserviert. Die Gene für die UE β , β' und β'' (*rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*) sind innerhalb eines Operons lokalisiert, während *rpoA* (für die UE α) zusammen mit Genen für ribosomale Proteine Teil eines anderen Operons ist (Sugiura, 1992). Die plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase des Bakterientyps (*plastid-encoded plastid RNA polymerase*, PEP) existiert in mehr als in einer Form. Neben einer DNA-gebunden Polymeraseaktivität (transcriptionally active chromosome; TAC; Briat et al., 1979; Hallick et al., 1976; Reiss und Link, 1985) wurden auch lösliche rifampicinsensitive (PEP-A) und -insensitive (PEP-B) Formen beschrieben (Pfannschmidt und Link, 1994). Neben der plastidenkodierten UE benötigt die PEP σ^{70} -ähnliche Spezifitätsfaktoren (Burton et al., 1981) für die Transkriptionsinitiation stromabwärts von Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu eubakteriellen -35/-10 Promotoren (s. Kap. I.1.4.1). Gene für bis zu sechs σ -Faktoren sind in Landpflanzen im Zellkern kodiert (Allison, 2000; Kanamaru et al., 1999; Tsunoyama et al., 2002). Die Expression der σ -Faktoren wird auf unterschiedliche Art reguliert, z. B. gewebes- und organspezifisch (Isono et al., 1997; Tan und Troxler, 1999) sowie licht- und entwicklungsabhängig (Lahiri und Allison, 2000; Oikawa et al., 1998).

I.1.3 Kernkodierte plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase (NEP)

In Pflanzen mit fehlender PEP-Aktivität, wie z. B. die nicht-photosynthetisierende parasitäre Pflanze *Epifagus virginiana*, der *rpo*-Gene fehlen (Morden et al., 1991), ribosomendefiziente Mutanten von Gerste *albostrans* (Bünger und Feierabend, 1980; Hess et al., 1993; 1994) sowie *iojap*-Mutanten von Mais (Han et al., 1992), wurde trotzdem in den Plastiden eine Transkriptionsaktivität nachgewiesen. Auch die vergleichbar geringen Effekte des Verlustes der PEP-Aktivität auf die plastidäre Transkription in transgenen Δrpo Tabakmutanten erbrachten einen Hinweis auf die Existenz einer weiteren plastidären Transkriptionsaktivität (Allison et al., 1996; De-Santis MacIossek et al., 1999; Krause et al., 2000). In Mutanten mit fehlender PEP-Aktivität akkumulieren große Mengen von Transkripten, die nicht an Promotoren des σ^{70} -Typs, welche durch die PEP erkannt werden, initiiert werden. Sequenzvergleiche der Promotorregionen dieser Transkripte zeigen hohe Ähnlichkeiten der direkt stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstellen lokalisierten

Bereiche zu mitochondrialen Promotoren (Allison et al., 1996; Fey und Maréchal-Drouard, 1999; Hajdukiewicz et al., 1997; Kapoor et al., 1997). Die Empfindlichkeit dieser Transkriptionsaktivität gegenüber Inhibitoren ist vergleichbar mit der von RNA-Polymerasen der T7-Phagen, jedoch anders als die der PEP (Kapoor et al., 1997; Liere und Maliga, 1999; Sakai et al., 1998). Das führte zu der Annahme, dass die Plastiden neben der eubakteriellen PEP eine zweite plastidenlokalisierte, aber kernkodierte Transkriptionsaktivität (*nuclear-encoded plastid RNA polymerase*, NEP) beinhalten, die an der Transkription bestimmter plastomkodierter Gene beteiligt ist (Hess und Börner, 1999; Liere und Börner, 2007). Diese Annahme wurde durch eine biochemische Charakterisierung einer 110 kDa großen, aus einer Untereinheit bestehenden, plastidären RNA-Polymeraseaktivität mit Ähnlichkeiten zu RNA-Polymerasen der T7-Phagen unterstützt (Lerbs-Mache, 1993). Mit der Identifizierung des nukleären Gens *RpoTp* aus der dikotylen Pflanze *Arabidopsis thaliana* (in Hedtke et al., 1997 als RpoZ bezeichnet) und weiterer nukleärer Gene aus den monokotylen Pflanzen Mais (Chang et al., 1999) und Weizen (Ikeda und Gray, 1999) gelang die Klonierung und Sequenzierung von Kandidatengenen für dieses zweite plastidäre Transkriptionsenzym. Die Analyse der nukleären Genome höherer Pflanzen hat die Existenz weiterer Gene aufgezeigt, welche organelläre Phagentyp-RNA-Polymerasen kodieren. Neben des plastidären Imports (RpoTp; Abb. 2) wurde für ein zweites *RpoT*-Genprodukt ein Import in Mitochondrien in Mono- und Dikotylen gezeigt (RpoTm; Chang et al., 1999; Emanuel et al., 2004; Hedtke et al., 1997; 2002; Kusumi et al., 2004; Weihe et al., 1997). Des Weiteren wurde bisher ausschließlich in dikotylen Pflanzen eine dritte Phagentyp-RNA-Polymerase gefunden (RpoTmp), für die ein sog. *Targeting* in Mitochondrien und Plastiden von *Arabidopsis thaliana* und Tabak nachgewiesen wurde (Hedtke et al., 2000; 2002; Kobayashi et al., 2001). Weiterhin wurde in Spinat neben der PEP und der kernkodierten RNA-Polymerase (NEP-1) die Existenz einer dritten plastidären Transkriptionsaktivität (NEP-2) beschrieben, welche zwar in der Lage ist, *in vitro* einen Promotor vom T7-Phagentyp zu erkennen, aber von einem gegen NEP-1 gerichteten Antikörper nicht erkannt wird (Bligny et al., 2000).

I.1.3.1 Verbreitung von Genen organellärer Phagentyp-RNA-Polymerasen

Abgesehen von extrachromosomal plasmidkodierten Sequenzen fehlen mit Ausnahme der flagellierten Frischwasser-Protozoe *Reclinomonas americana*, welche ein eubakterienähnliches Chondrom besitzt, in allen bisher untersuchten mitochondrialen

Genomen nicht-grüner Organismen Gene, die RNA-Polymerasen kodieren (Lang et al., 1997). In diesem primitiven Eukaryoten sind die Komponenten der eubakterienähnlichen $\alpha_2\beta\beta'$ RNA-Polymerase im Chondrom kodiert. Chondrome photosynthetisierender Eukaryoten, dessen mitochondriale Genome bisher sequenziert wurden, beinhalten keine Gene für RNA-Polymerasen (*Marchantia polymorpha*, Oda et al., 1992; *Arabidopsis thaliana*, Unseld et al., 1997; *Chlamydomonas reinhardtii*, A. Weihe, unpublizierte Daten). Da nur Mitochondrien einiger höherer Pflanzen extrachromosomale lineare Plasmide mit Genen für putative Phagentyp-RNA-Polymerasen beherbergen, wird diesen keine Rolle bei der Transkription des Chondroms zugeteilt (Hess und Börner, 1999). Aus diesem Grund werden die mitochondrialen RNA-Polymerasen der Pflanzen und Algen durch ein oder mehrere Kerngene kodiert (Shadel und Clayton, 1993; Tracy und Stern, 1995).

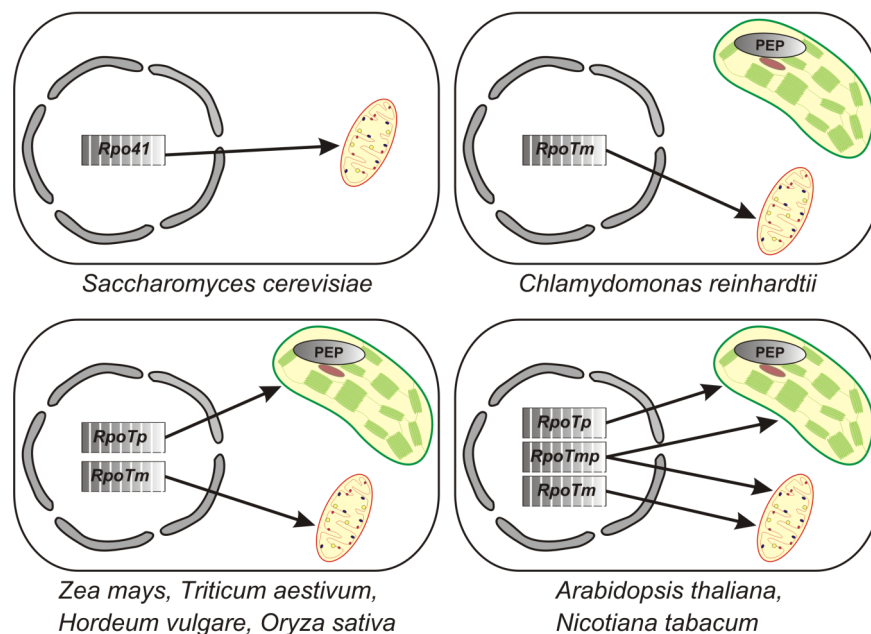


Abb. 2: Kerngene für organelläre Phagentyp-RNA-Polymerasen. Kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerasen, die nach ihrer Synthese im Cytoplasma in die Mitochondrien (rot) oder Plastiden (hier Chloroplasten, grün) importiert werden.

Das Chondrom der Bäckerhefe *S. cerevisiae* war das erste Genom, in dem die Transkription von einer durch das Kerngen *Rpo41* kodierten RNA-Polymerase mit Homologie zu Bakteriophagen gezeigt wurde (Abb. 2; Kelly et al., 1986; Masters et al., 1987). Untersuchungen weiterer Genome haben eine breite phylogenetische Verteilung homologer Gene für mitochondriale RNA-Polymerasen in niederen und höheren Eukaryoten

gezeigt (Cermakian et al., 1996; Chen et al., 1996; Hedtke et al., 1997; Tiranti et al., 1997; Weihe et al., 1997).

Die RNA-Polymerase pflanzlicher Mitochondrien, die plastidäre Transkriptionsaktivität NEP (s. Kap. I.1.3) sowie die mitochondrialen RNA-Polymerasen des Menschen und der Hefe und Polymerasen der Bakteriophagen bestehen aus einer einzigen Untereinheit und sind phylogenetisch miteinander verwandt. Eine DNA-Polymerase oder eine reverse Transkriptase wird als Vorfahre einer ursprünglichen, aus einer Untereinheit bestehenden, RNA-Polymerase (*ssRNAP*; *single subunit RNA polymerase*) vermutet, die Vorgänger heutiger phagenkodierter und kernkodierter, phagentypähnlicher RNA-Polymerasen war (Cermakian et al., 1997). In Anbetracht der evolutionären Herkunft der kernkodierten RNA-Polymerasen wird in unterschiedlichen Szenarien angenommen, dass das Gen, welches die *ssRNAP* kodiert, seinen Ursprung zum Zeitpunkt der mitochondrialen Endosymbiose in der eukaryotischen Wirtszelle hat (Cermakian et al., 1997). Wie und warum eine *ssRNAP* die Transkription mitochondrialer DNA übernommen hat, ist bisher ungeklärt. Im Gegensatz dazu ist die Verknüpfung der verschiedenen, in Arabidopsis und einigen anderen höheren Pflanzen vorhandenen *RpoT*-Gene, und besonders die Evolution der NEP in Plastiden, besser verstanden. So entstanden die Arabidopsis-Gene *RpoTm*, *RpoTmp* und *RpoTp* durch eine Genduplikation aus dem ursprünglichen, die mitochondriale RNA-Polymerase kodierenden, Gen. Diese Tatsache wird gestützt vor allem durch die hohen Sequenzähnlichkeiten der kodierenden Regionen und die identischen Positionen aller 18 Introns in den drei Genen (Cermakian et al., 1997; Hedtke et al., 1997; Hess und Börner, 1999). Zu welchem Zeitpunkt die Pflanzen jedoch eine Aktivität der NEP im Verlauf der Evolution benötigt haben, bleibt ungeklärt. Analysen von niederen photosynthetisierenden Eukaryoten haben keine NEP-Aktivität gezeigt (*Chlamydomonas reinhardtii*, Lilly et al., 2002; *Cyanidioschyzon merolae*, Matsuzaki et al., 2004).

I.1.4 Plastidäre Promotorstrukturen

Basierend auf Vergleichen von Wildtyp- mit transplastomischen Tabak-Pflanzen mit fehlender PEP-Aktivität wurden plastidäre Gene hinsichtlich ihrer Promotoren in drei Klassen unterteilt (Hajdukiewicz et al., 1997). Da die Transkriptionsaktivität der Photosynthesegene und Operons hauptsächlich PEP-abhängig ist, haben diese Gene einen PEP-Promotor (Klasse I). Im Gegensatz dazu haben viele Haushaltsgene mit Funktionen in der Transkription und Translation sowohl einen PEP- als auch einen NEP-Promotor (Klasse

II), obwohl einige von ihnen, wie z. B. das *accD* Gen, welches die β -UE der Acetyl-CoA-Carboxylase kodiert, oder das *rpoB*-Operon, welches drei der vier UE des *core*-Enzyms der PEP kodiert, ausschließlich einen NEP-Promotor haben (Klasse III; Hajdukiewicz et al., 1997; Maliga, 1998). PEP und NEP erkennen unterschiedliche Promotortypen mit Ähnlichkeiten zu eubakteriellen σ^{70} -Typ-Promotoren (PEP; s. Kap. I.1.4.1) oder T3/T7 Phagentyp-Promotoren (NEP; s. Kap. I.1.4.2). Dabei variiert die Effizienz der Transkriptionsinitiation selbst innerhalb der Gruppe des gleichen Promotortyps. In plastidären Promotoren haben *in vitro*- und *in vivo*-Lösungsansätze eine Charakterisierung von *cis*-Elementen ermöglicht, welche als Antwort auf Entwicklungs- und Umweltsignale die Promotorstärke bestimmen und die Effizienz der Transkriptionsinitiation regulieren können (Allison und Maliga, 1995; Gruissem und Zurawski, 1985; Hanley-Bowdoin et al., 1985; Sexton et al., 1990). Im Folgenden werden die Transkriptionsstartpunkte und die sie umgebende Sequenz, die den plastidären Promotor beinhaltet, mit dem Buchstaben P (für *promoter*, dt.: Promotor), gefolgt vom Gennamen und von der Position des initiiierenden Nukleotids hinsichtlich des Translationsstartpunktes oder der reifen rRNA, angegeben, z. B. *PclpP*-53.

I.1.4.1 Promotoren der plastidenkodierten plastidären RNA-Polymerase (PEP)

Da sich die plastidenkodierte plastidäre RNA-Polymerase PEP aus höheren Pflanzen und Algen höchstwahrscheinlich aus der RNA-Polymerase des cyanobakteriellen Endosymbionten entwickelt hat, erkennt sie Promotoren, welche die für Eubakterien typischen Konsensusmotive -35 (5'-TTGaca-3') und -10 (5'-TAtaaT-3') der *E. coli* σ^{70} -Typ-Promotoren beinhalten (zur Übersicht s. Gruissem und Tonkyn, 1993; Hess und Börner, 1999; Liere und Maliga, 2001; Link, 1994; Abb. 3; Reznikov et al., 1985; Weihe, 2004). Tatsächlich ist das Holoenzym der *E. coli* RNA-Polymerase in der Lage, plastidäre σ^{70} -Typ-Promotoren zu erkennen (Boyer und Mullet, 1988; Bradley und Gatenby, 1985; Gatenby et al., 1981). Einige plastidäre σ^{70} -Typ-Promotoren beinhalten zusätzliche *cis*-Elemente mit regulatorischen Funktionen. Ein Beispiel dafür ist der Promotor vom *psbA* Gen, welches das D1-Polypeptid des PS II kodiert (Eisermann et al., 1990; Gruissem und Zurawski, 1985). In Weizen ist zwischen den konservierten -35- und -10-Elementen dieses Promotors eine TATA-Box mit Homologie zu eukaryotischen Sequenzelementen von der RNA-Polymerase II transkribierter Kerngene lokalisiert, sowie ein TGn-Motiv, das sich ein Basenpaar stromaufwärts des -10-Elements befindet (Bown et al., 1997; Satoh et al., 1999). Im

Gegensatz dazu trägt der Promotor vom *psbD* Gen, welches das D2-Protein des PS II kodiert, mit gering konservierten und sehr eng beieinander liegenden -35/-10-Hexameren eine AAG-Box stromaufwärts des -35-Elements (Allison und Maliga, 1995; Liere und Maliga, 2001; Thum et al., 2001).

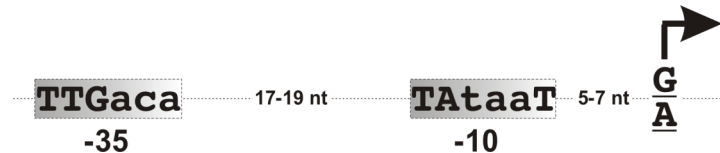


Abb. 3: Konsensusmotive von Promotoren plastidenkodierter plastidärer RNA-Polymerase PEP höherer Pflanzen. Die -35/-10-Elemente sind grau unterlegt. Transkriptionsstartpunkte sind unterstrichen. Kleinbuchstaben zeigen Positionen geringer Konservierung in charakterisierten Promotoren. nt Nukleotide. (Nach Liere und Maliga, 2001).

I.1.4.2 Promotoren der kernkodierten plastidären RNA-Polymerase (NEP)

Die NEP-Transkriptionsaktivität wird durch RNA-Polymerasen mit Ähnlichkeiten zu RNA-Polymerasen der T7-Phagen dargestellt (Chang et al., 1999; Lerbs-Mache, 1993; Liere und Maliga, 1999; Liere et al., 2004). Die Transkriptionsinitiationsstellen der NEP-Transkriptionsaktivität wurden in Pflanzen mit reduzierter oder fehlender PEP-Aktivität identifiziert (Hübschmann und Börner, 1998; Liere und Maliga, 1999; Silhavy und Maliga, 1998). Durch *Primer Extension* Analysen und Sequenzvergleiche konnten konservierte Promotorelemente der NEP-Promotoren definiert werden (Hajdukiewicz et al., 1997). Diese Elemente unterscheiden sich von denen der σ^{70} -Typ-Promotoren der PEP. Die meisten NEP-Promotoren beinhalten in Mono- und Dikotylen ein hoch konserviertes *core*-Motiv, das von einer weniger konservierten AT-reichen Sequenz flankiert wird (YRTa; Typ-Ia; Abb. 4) und haben Ähnlichkeiten zu Promotoren von Bakteriophagen und pflanzlichen Mitochondrien (Binder und Brennicke, 2003; Kühn et al., 2005; Liere und Maliga, 1999; 2001; Weihe und Börner, 1999). In allen bisher untersuchten Typ-I NEP-Promotoren befindet sich das innerhalb eines kurzen DNA-Fragments (-15 bis +5) eingeschlossene YRTa-Motiv unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (+1) und ist entscheidend für die Promotorerkennung (PatpB-289, Kapoor und Sugiura, 1999; PrpoB-345 und PaccD-129, Liere und Maliga, 1999; 1999b). Eine Subklasse von NEP-Promotoren beinhaltet ein zweites, hoch konserviertes Motiv, eine GAA-Box (ATAN₀₋₁GAA), welche sich stromaufwärts des YRT-Motivs befindet (Typ-Ib; Abb. 4; Kapoor und Sugiura, 1999). *in vitro*- und *in vivo*-Transkriptionsanalysen der Mutagenese

dieses Motivs weisen auf seine Rolle bei der Promotorerkennung hin (PatpB-289 aus Tabak, Kapoor und Sugiura, 1999; Xie und Allison, 2002).

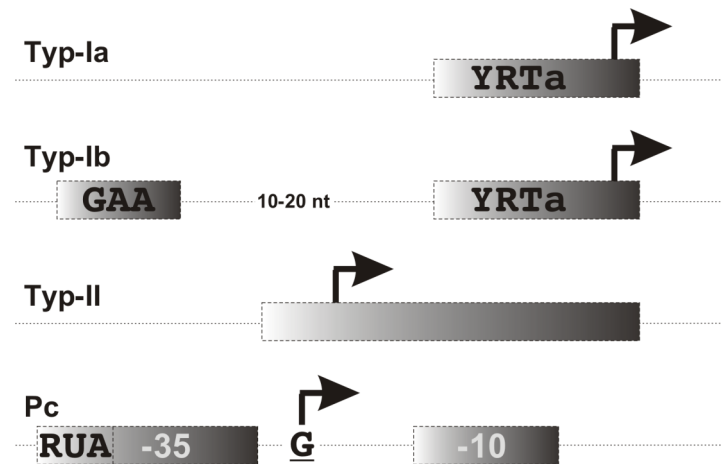


Abb. 4: Typen von Promotoren kernkodierter plastidärer RNA-Polymerase NEP höherer Pflanzen. Essentielle Elemente sind grau unterlegt. Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile markiert. nt Nukleotide. (Suzuki et al., 2003; Nach Weihe und Börner, 1999).

Typ-II NEP-Promotoren haben im Gegensatz zu Typ-I NEP-Promotoren eine vollkommen abweichende Sequenz und Organisation (Typ-II; Abb. 4). Sie beinhalten kein YRTa-Motiv und vermitteln die Transkriptionsinitiation durch ein langes DNA-Fragment (-5 bis +25). Einziges bisher charakterisiertes Beispiel in Dikotylen ist der Promotor des *clpP* Gens, welches die proteolytische Untereinheit der Clp-Protease kodiert (PclpP-53 aus Tabak, Sriraman et al., 1998). Das Promotormotiv von PclpP-53 und die Transkriptionsinitiationsstelle sind konserviert zwischen Monokotylen, Dikotylen, Koniferen und Moosen, was auf eine frühe Herausbildung der NEP-abhängigen Transkriptionsmaschinerie hindeutet. Das Motiv ist auch in *Chlamydomonas* und Reis vorhanden, obwohl es dort nicht als Promotor genutzt wird. Dieses könnte aus dem Fehlen von spezifischen Faktoren zur Erkennung von Typ-II NEP-Promotoren oder der entsprechenden Phagentyp-RNA-Polymerase (z. B. RpoTnp) in Monokotylen resultieren (Liere et al., 2004; Sriraman et al., 1998). Des Weiteren wurde in Spinat, Senf und Arabidopsis in der hoch konservierten stromaufwärts des *rrn*-Operons gelegenen Region ein zusätzlicher sog. *non-consensus* Promotor, der Pc-Promotor, lokalisiert. Dieser Promotor ermöglicht eine Initiation der Transkription des *rrn*-Operons an einem Startpunkt, welcher zwischen den konservierten -35/-10-Hexameren lokalisiert ist (Sriraman et al., 1998; Pc; Abb. 4; Vera und Sugiura, 1995). Zusätzlich wurde in Tabakplastiden stromaufwärts des -

35-Promotorelements eine in Mono- und Dikotylen konservierte, essentielle Hexamersequenz GTGGGA, ein Aktivator des rRNA-Operons, lokalisiert (RUA; rRNA operon upstream activator; Suzuki et al., 2003). Obwohl der Pc-Promotor auch auf den Plastomen von Tabak und Gerste vorkommt, ist er dort nicht aktiv (Allison et al., 1996; Hübschmann und Börner, 1998; Silhavy und Maliga, 1998). Die in Spinat beobachtete Korrelation der Bindung des Faktors CDF2 mit der Transkription vom Pc-Promotor deutet auf seine mögliche Funktion als Pc-Promotor-aktivierenden Faktor hin (1997; Iratni et al., 1994). Es wird angenommen, dass der DNA-bindende Komplex CDF2 in zwei unterschiedlichen Formen vorkommt. Während CDF2-A die Initiation der Transkription des *rrn*-Operons am PEP-Promotor hemmt, bindet CDF2-B möglicherweise an die dritte plastidäre Transkriptionsaktivität NEP-2 und initiiert die Transkription vom Pc-Promotor des *rrn*-Operons (Bligny et al., 2000).

I.1.4.3 Plastidäre tRNA-Gene und ihre Promotoren

Das plastidäre Genom höherer Pflanzen kodiert alle tRNA-Spezies, welche für die Proteinbiosynthese benötigt werden (1990; Pfitzinger et al., 1987). Aus diesem Grund sind die Chloroplasten von Landpflanzen, anders als Mitochondrien (Green et al., 1987; Maréchal-Drouard et al., 1988; Small et al., 1992), nicht auf den Import von tRNAs aus dem Cytosol angewiesen. Das plastidäre Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert 37 tRNA-Gene (Sato et al., 1999), wobei 31 Anticodons genutzt werden, um den universellen genetischen Code zu übersetzen (Jukes und Osawa, 1990). Die plastidären tRNA-Gene sind, über das gesamte Plastom verteilt und sowohl in den Einzelkopiebereichen, als auch in identischen, gegenläufigen Sequenzabfolgen lokalisiert (Hiratsuka et al., 1989; Sugiura und Wakasugi, 1989). Einige wenige tRNA-Gene, wie *trnE*^{UUC}, *trnY*^{GUA} und *trnD*^{GUC}, werden co-transkribiert (Ohme et al., 1985). Auch die beiden Gene *trnI*^{GAU} und *trnA*^{UGC} sind innerhalb des *rrn16*-Operons lokalisiert und werden gemeinsam mit den Genen der ribosomalen RNAs transkribiert (Abb. 1; Delp und Kössel, 1991; Wakasugi et al., 1986). Aus diesem Grund werden, je nach Lokalisation im Genom, die tRNAs als unreife mono- oder polycistronische Vorläufermoleküle synthetisiert.

Die meisten plastidären tRNA-Gene werden von σ^{70} -Typ-Promotoren durch die PEP transkribiert. Die Transkription einiger tRNA-Gene, wie z. B. *trnR*, *trnS* und *trnT* aus Spinat (Cheng et al., 1997; Gruissem et al., 1986) und *trnS*, *trnH* und *trnR* aus Senf (Liere und Link, 1994; Neuhaus und Link, 1990; Nickelsen und Link, 1990) sowie das *trnE* Gen

aus *Chlamydomonas* (Jahn, 1992) wird anscheinend jedoch von internen Promotoren bewerkstelligt. In Spinat wurde die Initiationsstelle der Transkription des *trnS* Gens an der Position -12 stromaufwärts des kodierenden Bereichs lokalisiert (Wu et al., 1997). Dabei wurde in der *in vitro*-Analyse der Transkription des *trnS*-Promotors gezeigt, dass eine AT-reiche Sequenz (-31 bis -11) bedeutend für eine effiziente Transkription ist, obwohl sie keine Elemente mit Ähnlichkeiten zu σ^{70} -Typ- oder NEP-Promotoren beinhaltet. Der kodierende Bereich von *trnS* beinhaltet jedoch Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu A- und B-Boxen nukleärer tRNA-Promotoren, welche durch die eukaryotische RNA-Polymerase III transkribiert werden (Geiduschek et al., 1995), was auf die mögliche Anwesenheit einer RNA-Polymerase III-verwandten Aktivität in Plastiden hindeutet.

I.1.5 Wirkung von Inhibitoren auf die plastidäre Biogenese

Seitdem bekannt ist, dass spezifische Inhibitoren, wie z. B. Spectinomycin oder Chloramphenicol, die Translation an 70S-Ribosomen hemmen, wurden schon frühzeitig Untersuchungen zur Inhibition der plastidären Proteinbiosynthese durchgeführt (Ellis und Hartley, 1971; Galling et al., 1973; Loiseaux, 1976; Mesquita, 1971). Die Analyse der Wirkungsweise hat gezeigt, dass Spectinomycin an die 30S-Ribosomenuntereinheit bindet und die Translokation der Peptidyl-tRNA stört (Carter et al., 2000). Chloramphenicol hingegen verhindert durch die Bindung an die 50S-Ribosomenuntereinheit die Ausbildung der Peptidbindung zwischen zwei aufeinander folgenden Peptiden (Schlunzen et al., 2001).

Anders als Chloramphenicol, das in *Ochromonas danica*, einer Chrysophytenalge, neben der Inhibition des Wachstums und der Differenzierung von Chloroplasten auch zum Verlust der tubulären Struktur der Mitochondrien führt (Smith-Johannsen und Gibbs, 1972), wurde für Spectinomycin kein Effekt auf die Synthese mitochondrialer rRNA und Mitochondrienstruktur gezeigt (Smith-Johannsen et al., 1980). Auch in höheren Pflanzen hemmt Spectinomycin die plastidäre Translation und hat keinen direkten Effekt auf die Mitochondrien oder den Zellkern (2002; Zubko und Day, 1998). Bisher wurden auch keine reinen Albino-Pflanzen aufgrund mitochondrialer Defekte isoliert, wogegen der durch plastidäre Defekte verursachte Albinismus häufig beschrieben wurde (Allison et al., 1996; Bauer et al., 2002; Sundberg et al., 1997; Till et al., 2001). In dikotylen Pflanzen führt Wachstum auf Spectinomycin zur fehlenden PEP-Aktivität und Chlorophylldefizienz (Zubko und Day, 1998). Interessanterweise wurde unter den natürlich vorkommenden Nachkommen der Gersten-Mutante *albostrians* in weißen Keimlingen eine höhere

Transkriptmenge mitochondrialer Gene beobachtet als in grünen Keimlingen, während die Expressionsmuster plastidärer Gene und nukleärer Gene für plastidäre Proteine entgegengesetzt war (Börner und Hess, 1993).

I.1.6 Die Transkription plastidärer Gene

Die Verteilung der NEP- und PEP-Promotoren stromaufwärts plastidärer Gene führte zu dem Modell, dass die NEP die Transkription einiger Haushaltsgene, welche für die Komponenten der Maschinerie der Genexpression kodieren, übernimmt, während die PEP für die Transkription der Gene des Photosyntheseapparates zuständig ist (De-Santis Maclossek et al., 1999; Hajdukiewicz et al., 1997; Maliga, 1998). Da einige plastidäre Gene sowohl einen PEP- als auch einen NEP-Promotor haben, werden sie von beiden Transkriptionsaktivitäten abgelesen (Hess und Börner, 1999; Liere und Maliga, 2001). Ausgehend von diesen Daten wurde angenommen, dass die Aktivität der NEP in erster Linie in sehr frühen Entwicklungsstadien der Chloroplasten benötigt wird, um durch die Transkription der plastidären *rpo*-Gene die Aktivität der PEP zu initiieren. Die PEP dagegen spielt eine wichtige Rolle im grünen Gewebe bei der Bereitstellung der Komponenten des Photosyntheseapparates (Hess und Börner, 1999). Die Situation in den Plastiden ist jedoch wesentlich komplexer. Nicht nur werden einige Gene mit NEP-Promotoren auch im grünen Blattgewebe stark exprimiert (z. B. *clpP*; Hajdukiewicz et al., 1997), darüber hinaus zeigten Import-Studien, dass neben der RpoTp auch die RpoTmp in die Plastiden importiert wird (Hedtkke et al., 1997; 2000; 1999). Die Frage zu einer distinkten Funktion der RpoTp und RpoTmp in der Transkription plastidärer Gene ist allerdings bisher immer noch offen. Erste Hinweise auf eine Rolle der RpoTp bei der plastidären Transkription brachte die Überexpression der RpoTp im transgenen Tabak. Diese Analysen haben eine verstärkte Transkription bestimmter Typ-I NEP-Promotoren, jedoch nicht vom Typ-II NEP-Promotor *PclpP-53* gezeigt, was eine Beteiligung der RpoTp an der Transkription der Typ-I NEP-Promotoren indiziert (Liere et al., 2004). Im Jahr 2006 wurde in *Arabidopsis* SCABRA Mutanten mit fehlender RpoTp-Aktivität veränderte Akkumulation NEP-generierter Transkripte von *rpoB*, *clpP* und *accD* beschrieben (Hricová et al.). *In vitro*-Transkriptionsstudien haben die Erkennung eines Typ-I NEP-Promotors durch die RpoTp demonstriert (Kühn et al., 2007). Obwohl eine Beteiligung der RpoTmp an der Transkription plastidärer Gene in *Arabidopsis* angezweifelt wurde (Kabeya und Sato, 2005) und für dieses Enzym *in vitro* keine Erkennung von NEP-Promotoren gezeigt werden

konnte (Kühn et al., 2007), gibt es Beobachtungen, die auf eine Funktion der RpoTmp als plastidäre RNA-Polymerase hindeuten. In der Analyse von *AthRpoTmp*-Homologen von Spinat wurde eine plastidäre, jedoch keine mitochondriale Lokalisation beobachtet (Azevedo et al., 2006). Untersuchungen von Arabidopsis-Insertionsmutanten unterstützen eine Funktion der RpoTmp eher bei der plastidären, als bei der mitochondrialen Transkription und weisen auf ihre Rolle in der frühen Pflanzenentwicklung hin (Baba et al., 2004). Des Weiteren zeigen Analysen von Arabidopsis-Pflanzen mit *PRpoT::GUS*-Fusionskonstrukten eine Funktion der RpoTmp im jungen nicht-grünen Gewebe (Emanuel et al., 2005). Schließlich deuten Analysen von Doppelmutanten *rpoTp/rpoTmp* auf eine Redundanz der Funktionen der RpoTp und RpoTmp in der pflanzlichen Entwicklung hin (Hricová et al., 2006). Trotz dieser Hinweise auf die Funktionen der beiden kernkodierten plastidären RNA-Polymerasen bei der plastidären Transkription, gibt es bisher keine Untersuchungen des Einflusses von Mutationen auf die Transkription von NEP-Promotoren. Weiterhin gibt es keine Indizien bezüglich der Notwendigkeit eines plastidären Imports von zwei Phagentyp-RNA-Polymerasen in dikotylen Pflanzen und hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Transkription gleicher Gene. Zudem bleibt die Frage unbeantwortet, welche der beiden RNA-Polymerasen für die Erkennung und Transkription von den sog. *non-consensus* Promotoren verantwortlich ist.

I.1.7 Regulation plastidärer Genexpression

Die Organisation der plastidären Gene in polycistronischen Transkriptionseinheiten (Sato et al., 1999) und die Abhängigkeit der Expression plastidärer Gene vom Entwicklungsstadium der Plastiden (Krupinska, 1992; Krupinska und Falk, 1994) deuten auf ein komplexes Netzwerk an Regulationsmechanismen der plastidären Genexpression hin. In der Tat findet die Regulation der plastidären Genexpression auf unterschiedlichen Ebenen statt. Obwohl der Regulation auf posttranskriptioneller Ebene, z. B. RNA-Prozessierung, Translation und posttranslationale Modifikation, eine weitaus größere Bedeutung für die plastidäre Genexpression zugesprochen wird, spielt die Regulation auf Transkriptionsebene eine besondere Rolle (Mayfield et al., 1995). Die unterschiedlichen Transkriptionsraten der plastidären Gene, die im Verlauf der lichtabhängigen Entwicklung und Differenzierung der Proplastide zum Chloroplasten starken Veränderungen unterliegen, zeigen die Bedeutung der Regulation der plastidären Transkription (Baumgartner et al., 1989; Rapp et al., 1992). Licht ist eines der wichtigsten Signale unter einer Vielzahl

unterschiedlicher Umweltfaktoren, welche die plastidäre Transkription regulieren können (Link, 1996; Mayfield et al., 1995). Im frühen Stadium der lichtinduzierten Entwicklung der Plastiden steigt die Transkriptionsaktivität der meisten plastidenkodierten Gene an, um die Komponenten des Photosyntheseapparates aufzubauen. Auch in reifen und in ergrünenden Blättern wurde eine lichtabhängige Transkription plastidärer Gene beobachtet (Chun et al., 2001; DuBell und Mullet, 1995; Hoffer und Christopher, 1997; Nakamura et al., 2003; Schrubar et al., 1990). Beispiele dafür sind nicht nur Photosynthesegene (*rbcL*, Isono et al., 1997; *psbA*, Klein und Mullet, 1990; *psbD-psbC*, Sexton et al., 1990), sondern auch Haushaltsgene (*atpB*, Isono et al., 1997). Die Analyse der Aktivierung der Transkription von Photosynthesegenen hat gezeigt, dass die Wahrnehmung der Lichtqualitäten durch unterschiedliche Photorezeptoren vermittelt wird und vom Entwicklungsstadium der Plastiden abhängt (Chun et al., 2001; Thum et al., 2001).

Bei der Koordination der Regulation der plastidären Transkription an *cis*-Elementen ist das Zusammenspiel der RNA-Polymerasen mit spezifischen regulatorischen *trans*-Faktoren von großer Bedeutung (zur Übersicht s. Liere und Börner, 2007). Ein gut charakterisiertes Beispiel dafür ist das Operon *psbD-psbC*, dessen Transkription von drei unterschiedlichen Promotoren initiiert werden kann. In Gerste wurde ein lichtabhängiger Wechsel in der Nutzung dieser verschiedenen Promotoren gezeigt (Gamble et al., 1987; Sexton et al., 1990). Eine besondere Bedeutung spielt dabei der innerhalb höherer Pflanzen hoch konservierte blaublichtabhängige Promotor (BLRP), welcher sich stromaufwärts des *psbD* Gens befindet. Dieser Promotor benötigt zur Initiation der Transkription lediglich das -10-Element (Kim et al., 1999). Dabei dienen stromaufwärts lokalisierte, hoch konservierte Elemente (PGT- und AAG-Box; vergl. Kap. I.1.4.1) als Bindungsstelle für Faktoren, welche allgemein die Transkription verstärken oder eine lichtabhängige Aktivierung der Transkription von *psbD* vermitteln können (Baba et al., 2001; Kim und Mullet, 1995; Nakahira et al., 1998).

Der Einfluss der Umwelt auf die plastidäre Genexpression wird vor allem während der Differenzierung von Proplastiden zu Etioplasten oder Chloroplasten deutlich. Analysen von Mutanten mit Defekten in der Photomorphogenese haben eine retrograde Kontrolle der nukleären Genexpression in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Plastiden gezeigt (Gray et al., 2003; Leister, 2005; Rodermel, 2001). Dabei stellt die plastidäre Transkription eine wichtige Grundlage zur Bildung von solchen plastidären Signalen dar.

I.2 Zielstellung der Arbeit

Obwohl *Arabidopsis thaliana* sehr gut als Modelorganismus in der modernen Pflanzenbiologie etabliert ist, ist nur wenig über ihre plastidären Promotoren bekannt. Zusätzlich zu einigen PEP-Promotoren (PpsaA-188, Fey et al., 2005; PpsbD-946, Hoffer und Christopher, 1997; PpsbA-77, Liere et al., 1995; Prn16-112, Sriraman et al., 1998) sind bisher nur zwei NEP-Promotoren in *Arabidopsis* (Prn16-139 und PclpP-58, 1998; Sriraman et al., 1998) identifiziert worden. Dabei sind die Fragen nach Nutzung unterschiedlicher Promotoren und Funktion verschiedener RNA-Polymerasen in der Expression plastidärer Gene bisher noch offen. Die Identifikation weiterer NEP-Promotoren in *Arabidopsis* ist eine wichtige Voraussetzung, um die Promotorspezifität der kernkodierten, plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp zu untersuchen.

Um die Promotornutzung zu untersuchen, sollten mittels 5'-RACE Analyse in Verbindung mit enzymatischer Behandlung der RNAs primäre mit sekundären RNA-5'-Enden von Transkripten plastidärer Gene von *Arabidopsis* verglichen werden. Da bisher keine Mutanten oder transplastomische Pflanzen von *Arabidopsis* mit fehlender PEP-Aktivität bekannt sind, sollte für die Promotoranalyse chlorophylldefizientes Gewebe aus spectinomycinbehandelten *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet werden. Zur Unterscheidung von NEP- und PEP-Promotoren, sollten die Transkriptionsinitiationsstellen aus Plastiden des behandelten und unbehandelten Gewebes miteinander verglichen werden.

Es ist größtenteils anerkannt, dass die Genprodukte von *RpoTp* und *RpoTmp* die NEP-Transkriptionsaktivität in Plastiden bisher untersuchter dikotyler Pflanzen stellen (Hedtke et al., 1997; 2000; 2002; 1999). Dabei sind jedoch ihre individuellen Funktionen in der plastidären Transkription weitgehend ungeklärt. Um diese Rollen aufzuklären, sollten in dieser Arbeit transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit verminderter und fehlender RpoTp-Aktivität untersucht werden. Dabei sollte speziell der unterschiedliche Effekt der veränderten RpoTp-Aktivitäten auf die Nutzung plastidärer NEP-Promotoren unterschiedlichen Typs analysiert werden, um eine mögliche Arbeitsteilung zwischen der RpoTp und RpoTmp zu charakterisieren.

Die entwicklungs- und gewebsabhängige Regulation der Genexpression in Plastiden ist auf eine koordinierte Expression plastidärer und nukleärer Gene angewiesen. Dabei spielen äußere Einflüsse auf die Expression beider Genome eine wichtige Rolle. Obwohl die Auswirkung äußerer Einflüsse, wie z. B. Licht, auf die Expression des Plastoms bisher in

vielen Studien untersucht wurde (Liere und Börner, 2007; Übersicht in Shiina et al., 2005), fehlen Informationen über ihre Auswirkung auf die Expression der kernkodierten, plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp. Um diese Wissenslücke zu schließen, sollte in dieser Arbeit unter Verwendung von Arabidopsis-Pflanzen mit integrierten *PRpoTp/RpoTmp::GUS*-Fusionskonstrukten die Wirkung von Licht und Salinität auf die Expression von RpoTp und RpoTmp analysiert werden. Darüber hinaus sollten Informationen über eine Korrelation der Expression von *RpoTp* und *RpoTmp* mit der Expression ihrer plastidärer Zielgene unter veränderten Lichtbedingungen erhalten werden.

II Material und Methoden

II.1 Material

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Ambion, Biozym, Roth, ICN Biomedical, Invitrogen GmbH, Serva, Sigma und Qiagen bezogen. Radiochemikalien wurden durch Amersham Buchler und Perkin Elmer geliefert. Desoxy- und Ribonukleosidtriphosphate wurden von der Firma Fermentas und Oligonukleotide von den Firmen Sigma und Eurogentec bezogen. Die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden mittels des Computerprogramms *Oligo Calculator* (http://www.genscript.com/cgi-bin/tolls/primer_calculation) ermittelt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in den entsprechenden Abschnitten in tabellarischer Form zusammengefasst.

Reinstwasser wurde aus der *USF Purelab Plus System* Anlage entnommen. Die notwendige Sterilisierung der Lösungen und Puffer und Inaktivierung gentechnisch veränderter Organismen erfolgte im Dampfsterilisator *Varioklav 75 S* (Thermo Scientific) für 20 min bei 120°C und 55 kPa.

II.1.1 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana-Pflanzen des Ökotyps Columbia wurden bei einer Temperatur von 20°C wahlweise auf SEA-Medium in Petrischalen oder auf Blumenerde unter Kurztag- oder Langtagbedingungen angezogen. In dieser Arbeit untersuchte transgene Pflanzen wurden entsprechend ihrer plasmidkodierte Antibiotikaresistenz angezogen. Ihre Eigenschaften sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Zur Oberflächensterilisierung wurden die Samen für 5 min im 70 %igen (v/v) Ethanol und für 15 min in Sterilisierungslösung inkubiert und anschließend fünffach mit sterilem Aqua bidest gewaschen. Zur Gewinnung von Wurzelgewebe keimten die sterilen Samen auf 0,25 %iger Agarose in unten offenen Reaktionsgefäßen und wurden anschließend in Nährlösung (Schmidt und Schikora, 2001) getaucht. Die Samen wurden zur Vernalisierung bei 4°C aufbewahrt.

SEA-Medium:	0,44 % (w/v) MS Basalmedium; 0,05 % (w/v) MES in A. bidest; pH 5,7 mit KOH; 1,5 % (w/v) Agar für Pflanzenzellkulturen
Nährlsg.:	3 mM KNO ₃ ; 0,5 mM MgSO ₄ ; 1,5 mM CaCl ₂ ; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM K ₂ SO ₄ ; 25 µM H ₃ BO ₃ ; 1 µM MnCl ₂ ; 0,5 µM ZnSO ₄ ; 0,05 µM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ; 0,3 µM CuSO ₄ ; 40 µM FeEDTA; pH 6,0 mit KOH
Sterilisierungslsg.	5 % Natriumhypochlorid; 1 % SDS

Die Blumenerde wurde zur Auflockerung der Erdmischung und damit für eine optimale Durchwurzelung mit $\frac{1}{3}$ Volumen Vermiculit gemischt.

II.1.2 Bakterienstämme

E. coli Top10 (Invitrogen) diente als Wirtsstamm zur Vermehrung rekombinanter Plasmide. Die Zellen wurden in LB-Medium oder auf LB-Agar unter Standardbedingungen (Sambrook und Russell, 2001) angezogen.

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl in A. bidest
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar

Tab. 1: Eigenschaften verwendeter Pflanzen

Pflanze	Insertion
Tp(1x)	RpoTp 8.3; 1x CDS für AS 1-993 der RNAP RpoTp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number AT2G24120.1, Basenposition 112-3093; <i>pat</i> Gen aus <i>S. hygroscopicus</i> (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008)
Tp(5x)	RpoTp Z2-15; 5x CDS für AS 1-993 der RNAP RpoTp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number AT2G24120.1, Basenposition 112-3093; <i>pat</i> Gen aus <i>S. hygroscopicus</i> (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008)
PRpoTmp:: <i>GUS</i>	RpoTmp G101 und RpoTmp G83; 756 bp und 2238 bp lange Sequenz der 5'UTR bis zum ATG der RNAP RpoTmp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number AT5G15700.1; <i>pat</i> -Gen aus <i>S. hygroscopicus</i> (Emanuel et al., 2005)
PRpoTp:: <i>GUS</i>	RpoTp G137 und RpoTp G153; 2025 bp und 3420 bp lange Sequenz der 5'UTR bis zum ATG der RNAP RpoTp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number AT2G24120.1; <i>pat</i> Gen aus <i>S. hygroscopicus</i> (Emanuel et al., 2005)
<i>sca3-2</i>	T-DNA Insertion im Intron 3 der RNAP RpoTp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number AT2G24120.1 (Hricová et al., 2006)
<i>sca3-3</i>	T-DNA Insertion im Exon 18 der RNAP RpoTp aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number AT2G24120.1 (Hricová et al., 2006)

II.1.3 Plasmide

Die Beschreibung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide ist der Tabelle 2 zu entnehmen. Der Vektor *pDrive* wurde als Komponente des *PCR Cloning Kits* (Qiagen) kommerziell bezogen.

Tab. 2: Eigenschaften verwendeter Vektorkonstrukte

Plasmid	Insertion
pMS1	Promotorregion des <i>psbA</i> Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number NC_000932, Basenposition 1383-1567 (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008)
pMS3	Promotorregion des <i>clpP</i> Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number NC_000932, Basenposition 71774-72897 (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008)
pMS4	Promotorregion des <i>rpoB</i> Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , GenBank accession number NC_000932, Basenposition 26281-27626 (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008)

II.1.4 Anbieter

Applied Biosystems	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Ambion	Ambion, Inc., Austin, TX, USA
Amersham	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Amersham Biosciences	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Biometra	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, Richmond, VA, USA

Biozym	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln, Deutschland
Braun	Braun GmbH, Kronberg, Deutschland
Calbiochem	Calbiochem Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland
DuPont	DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Epicentre	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
Eurogentech	Eurogentech, Seraing, Belgien
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
GE Healthcare	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Jenoptik	Jenoptik L.O.S. GmbH, Jena, Deutschland
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Metabion	metabion international AG, Martinsried, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, USA
Nalgene	Nalgene®Labware, Rochester, NY, USA
peqLab	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Perkin Elmer	Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau, Deutschland
Pierce	Pierce, Rockford, IL, USA
Promega	Promega Corp., Madison, WI, USA
Qiagen	Qiagen, Hilden, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roth	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sorvall	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sigma	Sigma Chemical Company, St. Luis, MO, USA
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Thermo Scientific	Thermo Scientific LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
USF	USF, Seral Reinstwassersysteme GmbH, Deutschland
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, UK
Zeiss	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland

II.1.5 Computerprogramme

Zur Planung von Klonierungsstrategien, Erstellung von Plasmidkarten und Herstellung geeigneter Oligonukleotide wurden die Computerprogramme *Gene Construction Kit*, Version 2.5.13 der Firma TEXTCO, Inc. und *Primer 3*, Version 0.4.0 unter http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi (Rozen und Skaletsky, 2000) verwendet. Für Datenbankrecherchen und Homologieanalysen in öffentlichen Sequenzdatenbanken am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurde der *BLAST*-Algorithmus, Version 2.2.16 unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (1997; Altschul et al., 1990) genutzt. Multiple Sequenzvergleiche erfolgten mittels des Programms *Multialign*, Version 5.4.1 unter <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html> (Corpet, 1988). Die Erarbeitung von Text und Abbildungen sowie die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen Microsoft Word, Version 11.2, Adobe Photoshop, Version 9.0 und CorelDRAW, Version 11.

II.2 Methoden

II.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

II.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Genomische DNA aus verschiedenem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* wurde mittels der CTAB-Methode (Murray undThompson, 1980) isoliert.

II.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Minipräparation erfolgte durch die Methode der alkalischen Lyse (Sambrook undRussell, 2001). Größere Mengen Plasmid-DNA wurden unter Verwendung des *Plasmid Midi Kits* (Qiagen) nach Herstellervorgaben isoliert.

II.2.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA von *Arabidopsis thaliana*

Gesamt-RNA aus unterschiedlichem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* wurde wahlweise unter der Verwendung von TRIZOL®-Reagenz oder *Plant RNA Purification Detergent* (beides Invitrogen) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Das gewonnene RNA-Pellet wurde zweimal mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, in Reinstwasser aufgenommen und anschließend mittels des Kits *DNase-Free* (Ambion) DNaseI-verdaut. Bei geringen RNA-Ausbeuten wurde der DNase-Verdau alternativ mittels des *NucleoSpin RNA Plant Kits* (Macherey-Nagel) durchgeführt.

II.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte durch UV-Spektroskopie. Die optische Dichte der Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer *Nanodrop® ND-1000* (peqLab) gemessen. Die optische Überprüfung der Quantität und Qualität der Nukleinsäuren erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. II.2.3.1 und II.2.3.2).

II.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

II.2.3.1 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer vermischt und entsprechend ihrer Molekülgröße in 0,5-2,0 %igen (w/v) 1x TAE-Agarosegelen (Biozym) mit 0,2 µg/ml EtBr in 1x TAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt (Sambrook undRussell, 2001). Zur Auftrennung von DNA-Produkten aus der 5'-RACE Analyse wurden Agarosegele mit 1 % Agarose und 3 % *Nusieve* Agarose (Biozym) eingesetzt. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm in horizontalen Elektrophoresekammern (*PerfectBlue Gelsystem Mini S* oder *Mini L*, peqlab). Als Molekulargewichtmarker dienten wahlweise *1 kb DNA Ladder*, 100 bp

Plus DNA Ladder oder *50 bp DNA Ladder* (Fermentas). DNA-Banden wurden abschließend unter UV-Licht-Anregung im *Gel Doc XR System* (Bio-Rad) visualisiert.

Unter Verwendung präparativer Agarosegelelektrophorese konnten DNA-Fragmente extrahiert werden. Hierzu wurden DNA-Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAquick® *Gel Extraction Kits* (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers aufgereinigt.

1x TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA
DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol

II.2.3.2 Analytische Agarosegelelektrophorese von RNA

RNA-Proben wurden mit 3 Volumina Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 95°C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert, und anschließend mittels 1 %iger (w/v) 1x MEN-Agarosegele mit $\frac{1}{40}$ Volumen Formaldehyd in 1x MEN als Laufpuffer bei einer Spannung von 2,5-5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierten RNA-Moleküle wurden unter UV-Licht-Anregung im *Gel Doc XR System* (Bio-Rad) visualisiert.

10x MEN	200 mM MOPS; 50 mM NaOAc; 10 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH
RNA-Ladepuffer	1 ml Formamid; 350 µl Formaldehyd; 200 µl 10x MEN; 400 µl Glycerol; 5 µl 0,5M EDTA, pH 8,0; 10 µl 10mg/ml EtBr; 2 mg Bromphenolblau; 2 mg Xylencyanol; A. bidest ad 2 ml

II.2.3.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von DNA

Produkte der *Primer Extension* Analyse und der Sequenzierung von DNA nach der *Fast Sequencing*-Methode wurden mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Auftrennung größerer DNA-Fragmente in 0,4 mm dicken 4 %igen Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff in 1x TBE war möglich durch die hohe Auflösung der Elektrophorese im *Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus* (Biomatra). Nach einem 10-minütigen Vorlauf der Gele wurden die mit Formamidpuffer versetzten Proben für 5 min bei 85°C denaturiert und bei 55 W Konstantleistung in 0,6x TBE Laufpuffer für 1,5 h der Auftrennung unterzogen. Anschließend wurden die Gele auf 3 MM Filterpapier (Whatman) überführt, für 2 h im *Gel Dryer Model 583* (Bio-Rad) getrocknet und ü. N. auf *K-Type Imaging Screens* bei RT exponiert. *Imaging Screens* wurden mit Hilfe von Phosphorimager (*Molecular Imager FX*, Bio-Rad) visualisiert und mit der Computersoftware *QuantityOne®*, Version 4.6.2 (BioRad) ausgewertet.

Zur Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten wurden 12 %ige Polyacrylamidgele mit 8 M Harnstoff verwendet.

1x TBE	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 1 mM EDTA
Acrylamid Stocklsg.	Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 38:2, Roth)

II.2.4 Transfer von Nukleinsäuren

II.2.4.1 Northern-Transfer

Die in Formaldehyd-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennte RNA (Kap. II.2.3.2) wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers auf die Nylonmembran Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) transferiert.

II.2.4.2 Dot Blot-Transfer

1 µg genspezifischen DNA-Fragments wurde in eiskalter 0,5 M NaOH für 10 min bei 95°C denaturiert und unter angelegtem Vakuum im *Bio-Dot Microfiltration Apparatus* (Bio-Rad) auf die Nylonmembran Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) transferiert. Um die DNA auf der Membran zu fixieren, wurde die trockene Membran in der *GS GeneLinkerTM UV Chamber* (BioRad) mit UV-Licht und einer Energiemenge von 250 mJ bestrahlt.

II.2.5 cDNA-Synthese

cDNA wurde aus 5 µg Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* mittels *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) nach Herstellervorgaben unter der Verwendung von 200 ng *Random Hexamer Primer* (Roche) synthetisiert.

II.2.6 Amplifikation von DNA mittels PCR

DNA-Amplifikation erfolgte aus 100 ng genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* in 50 µl-Ansätzen in *Taq*-Reaktionspuffer (Qiagen) mit 2,5 U *Taq* DNA-Polymerase, je 10 pmol des Vorwärts- und des Rückwärtsoligonukleotids und je 10 nmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP im *Peltier Thermal Cycler PTC-200* (Biozym) unter folgenden Bedingungen: 94°C 3 min; 35 Zyklen: 94°C 30 sec, 54-65°C 30 sec, 72°C 1 min pro 1 kb der zu amplifizierten Fragmentlänge; 72°C 10 min.

Zur Überprüfung erfolgreicher Ligation von DNA-Fragmenten wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dies erfolgte in 20 µl-Ansätzen mit Zellen aus der Bakterienkolonie in *Taq*-Reaktionspuffer mit 1 U *Taq* DNA-Polymerase, je 5 pmol des Vorwärts- und des Rückwärtsoligonukleotids und je 5 nmol dNTPs.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. II.2.3.1).

II.2.7 Quantitative *real-time*-PCR

Die mRNA-Menge schwach transkribierter Gene wurde mittels quantitativer *real-time*-PCR detektiert. Für die Reaktion wurde wahlweise cDNA oder genomische DNA (Kap. II.2.1.1) von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt.

II.2.7.1 Reverse Transkription

cDNA für die *real-time*-PCR wurde aus 2 µg DNaseI-verdauter Gesamt-RNA (Kap. II.2.1.3) unter Verwendung des QuantiTect® *Reverse Transcription* Kits (Qiagen) nach Herstellervorgaben generiert.

II.2.7.2 *real-time*-PCR

Die *real-time*-PCR aus 50 ng cDNA (für kernkodierte Gene) und 5 ng cDNA oder 0,1 ng genomischer DNA (für plastidenkodierte Gene) wurde nach den Herstellervorgaben wahlweise unter der Verwendung des Kits *Sybr® Green PCR Core Reagent* (Applied Biosystems) oder des Kits *PCRTM Mastermix Plus* (Eurogentec) durchgeführt. Sie erfolgte mit je 0,9 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer unter folgenden Bedingungen: 50°C 2 min; 95°C 10 min; 40 Zyklen: 95°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 45 sec im *PCR-System 7500 Real-Time* (Applied Biosystems). Für alle Quantifizierungen dienten die Mengen der cytoplasmatischen TUA-mRNA oder 18S-rRNA als interner Standard unter Verwendung der Methode ΔC_T ($2^{-\Delta C_T}$ [$\Delta C_T = C_T$ des Zielgens - C_T der internen Referenz]). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der *7500 System SDS* Software, Version 1.2.3 (Applied Biosystems). Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Für die quantitative *real-time*-PCR eingesetzte Primer

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5'→3')	5'-Position in der DNA	T _m [°C] ¹
5' <i>AtRpoTm</i> _PL	ACAGAAATTGCGGCTAGGG	Zk Chr. I	60,2
3' <i>AtRpoTm</i> _PL	GGCATATGTGGCATTGGA	Zk Chr. I	60,3
5' <i>AtRpoTmp</i> _PL	CGATGCCATTGAACAAGAGAT	Zk Chr. V	60,1
3' <i>AtRpoTmp</i> _PL	TGTTCTTCATAGAAGTTTCATTTTC	Zk Chr. V	59,2
5' <i>AtRpoTp</i> _PL	TTGCAGAAGTGAAAGACATCTGA	Zk Chr. II	60,0
3' <i>AtRpoTp</i> _PL	ATCGACCGTGTTACCCCTCTC	Zk Chr. II	59,0
253 5' qPCR <i>AtclpP</i>	CCTATTGGCGTTCCAAAAGTA	71879	59,0
254 3' qPCR <i>AtclpP</i>	TCGCACTATATGTCAACCCAAG	71806	60,0
251 5' qPCR <i>AtpsbA</i>	CCTTGGATTGCTGTTGCATA	1024	59,0
252 3' qPCR <i>AtpsbA</i>	TTGGATAGATCAAGAAAACAGCAG	958	59,0
224 5' qPCR <i>AttrpB</i>	TCTCGGTCCGAAAAGTGC	24658	59,0
225 3' qPCR <i>AttrpB</i>	CGGGAACCCCTGAATCTAA	24589	59,0
5' <i>AtTUA</i> _PL	ACGGAATGATGCCGAGGT	Zk Chr. V	61,5
3' <i>AtTUA</i> _PL	CGAAGACAGCCCTAGGAACA	Zk Chr. V	60,4
5' <i>AtUBQ</i> _PL	CTTATCTTCGCCGGAAGC	Zk Chr. IV	59,9
3' <i>AtUBQ</i> _PL	GAGGGTGGATTCTTCTGG	Zk Chr. IV	59,4
<i>AtclpP</i> fw	TATGCAATTTGTGCGACCC	70767	60,5
<i>AtclpPrev</i>	TTGGTAATTGCTCCTCCGACT	70675	61,0
<i>AtnhdH</i> fw	CATACCGGTGGCAGCTTCGAA	122740	67,6
<i>AtndhH</i> rev	TCATCTGTTATGGCTCGGCCC	122854	66,6
<i>AtpsbA</i> fw	CATCCGTTGATGAATGGCTAT	1146	59,8
<i>AtpsbA</i> rev	AACTAAGTTCCCACTCACGACC	1042	59,5
<i>Atl6S1</i> fw	AACCCTGAACAGACTGCCGGT	102104/ 136545	65,4
<i>Atl6S1</i> rev	CGGCCATTGTAGCACGTGTG	102204/ 136445	65,8
25 5' <i>At18S</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	Zk Chr. II/ IV	57,3

¹ Schmelztemperaturen wurden unter http://www.genscript.com/cgi-bin/tolls/primer_calculation berechnet und gelten für genspezifische Abschnitte Breslauer, K.J.; Frank, R.; Blocker, H. und Marky, L.A. (1986): Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *PNAS* (Band 83), Nr. 11, S. 3746-3750..

II.2.8 Klonierung und Sequenzierung

Sofern nicht anders angegeben, wurden die molekularbiologischen Standardmethoden Verdau durch Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA-Molekülen nach Sambrook und Russel (2001) oder nach Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Fermentas bezogen. Der Vektor *pDrive* als Komponente des *PCR Cloning Kits* (Qiagen) wurde direkt zur Ligation eingesetzt.

II.2.8.1 Transformation von *E. coli*

2,5 µl eines Standardligationsansatzes wurde in 50 µl chemisch kompetenter Zellen von *E. coli* Top 10 (Invitrogen) gegeben, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach weiteren 2 min auf Eis und Zugabe von 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Die positiven Transformanten wurden entsprechend ihrer plasmidkodierten Antibiotikaresistenz in LB-Medium mit Antibiotikum selektiert. LB-Agar-Platten wurden zur Blau-Weiß-Selektion zusätzlich mit X-Gal (Fermentas) beschichtet (Kap. II.1.2).

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 20 mM Glucose; 8,6 mM NaCl; 25 mM KCl; 10 mM MgCl₂ in A. bidest; pH 7,0 mit NaOH

II.2.8.2 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von 200 ng Plasmid-DNA oder 40 ng PCR-Fragment wurde mit 5-10 pmol Oligonukleotid (Tab. 4) unter Verwendung des *ABI PRISMTM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* (Applied Biosystems) nach dem Temperaturprotokoll des Herstellers durchgeführt. Das *Cycle Sequencing*, sowie die Produktaufreinigung und -analyse am automatischen *ABI 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) wurden von Herrn Dr. M. Meixner (DLMBC, Rüdersdorf) durchgeführt.

Computergestützte DNA-Sequenzanalysen wurden mit den Programmen *SeqMan*, Version 7.1.0 (DNASTAR, Inc.), *4Peaks*, Version 1.6 (Mek&Tosj) und *Gene Construction Kit*, Version 2.5.13 (Textco, Inc.) durchgeführt.

Tab. 4: Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung von Plasmiden

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5'→3')	Ziel
M13-seq_fw	ACGACGTTGTAAAACGACGG	<i>pDrive</i>
M13-seq_rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	<i>pDrive</i>

II.2.9 *Primer Extension Analyse*

II.2.9.1 5'- Endmarkierung von Oligonukleotiden

10 pmol Oligonukleotid (Tab. 5) wurden in PNK-Reaktionspuffer A (Fermentas) in Gegenwart von 10 U T4 Polynukleotidkinase und 50 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ in einem Gesamtvolumen von 10 μl für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 40 μl 1x Hybridisierungspuffers wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit Hilfe von illustraTM *MicroSpin G-25* Säulen (GE Healthcare) abgetrennt.

10x Hybridisierungspuffer: 1,5 M KCl; 0,1 M Tris, pH 8,3; 10 mM EDTA

Tab. 5: Oligonukleotide aus der *Primer Extension Analyse*

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	5'-Position in der DNA	T _m [°C]
96 PE <i>AtaccD</i>	CCACGATTTTCCATAGAGCTTCTG	57089	66,9
99 PE1 <i>AtatpB</i>	CTGGATTTGAAGTAGTAGGATTTGTTCTCAT	54126	64,0
100 PE2 <i>AtatpB</i>	GGGAGTAAGCACTCGATTTTCGTTG	54249	65,2
4 PE3 <i>AtatpB</i>	CGGTTATGCGTCCCATTATTCATC	54537	66,2
5 PE4 <i>AtatpB</i>	CAAGCGGATGTGGAATTCAATTTT	54281	65,2
10 PE5 <i>AtatpB</i>	GATGAATTCCGCATATTGTCATATCTA	54597	61,4
11 PE6 <i>AtatpB</i>	ATTAGGTTGCGCTATACATATGAAAGAAT	54739	61,6
104 PE <i>AtclpP</i>	GGTACTTTTGGAAACGCCAATAGGC	71857	65,8
12 PE2 <i>AtclpP</i>	CCCAAGATGTATCTCTTCTCCAGG	71822	65,3
97 PE <i>AtpsbA</i>	TCCAGTTACAGAAGCGACCCCATAG	1384	66,6
98 PE <i>AtrbcL</i>	ACTTGCTTTAGTCTCTGTTTGTGGTGACAT	54987	66,3
171 PE1 <i>Atrpl33</i>	CATCTTTACCCTTGCCCATGA	67506	62,1
172 PE2 <i>Atrpl33</i>	GTCCCCGATTGTTGATTGTATCTC	67118	62,9
102 PE1 <i>AtrpoB</i>	CCTCTTTTTCATCCCCAAGCATC	26308	65,1
103 PE2 <i>AtrpoB</i>	CATCATTGGATCTGTTTCGAGCAG	26681	64,1
1 PE3 <i>AtrpoB</i>	CCACTTTACTTTTTTCATGTATTTTTTTTCATTG	26739	64,5
2 PE4 <i>AtrpoB</i>	TACTGAATCACATGAAATTTTATCCAACCTCC	26445	65,1
173 PE1 <i>Atrps18</i>	GATCGCTTGGATTTAGTAAAAAGTCG	67957	62,5
174 PE2 <i>Atrps18</i>	GCGGCTTCTTTCTTAATATCATTTTC	67570	60,7
197 PE3 <i>Atrps18</i>	GATCGGATCAAAATAAAAACGATTTTC	67877	62,1
420 PE1 <i>Atrrn4.5</i>	CAAGTCTACCGGTCTGTTAGGATGC	107698/ 130951	64,3
421 PE2 <i>Atrrn4.5</i>	GCACTTCCACTTGACACCTATCG	107654/ 130995	63,1
418 PE1 <i>Atrrn5</i>	ACCTCCCCTACAGTATCGTCACC	108040/ 130609	62,7
419 PE2 <i>Atrrn5</i>	TGGATTGGTGTGTTCTCTACG	107988/ 130661	63,3
101 PE <i>Atrrn16</i>	GTTTCATCCTGAGCCAGGATCGAAC	101046/ 137603	67,4
3 PE2 <i>Atrrn16</i>	CGAACTCTCCATGAGATTCATAGTTGC	101027/ 137622	65,3
6 PE3 <i>Atrrn16</i>	CGTAGACAAAGCTGATTCGGAATTG	100979/ 137670	65,1
7 PE4 <i>Atrrn16</i>	TCCATTCTTATTCGATCACAGCG	100844/ 137805	63,4
8 PE5 <i>Atrrn16</i>	GAGGGAGCAAGTCAAAATAGAAAAACT	100822/ 137827	62,4
9 PE6 <i>Atrrn16</i>	CTCGAACTGATGACTTCCACCAC	100766/ 137883	63,2
411 PE1 <i>Atrrn23</i>	CTAGGTATCCACCGTAAGCCTTTCC	104724/ 133925	64,2
412 PE2 <i>Atrrn23</i>	CTCCGGATCTACGCTTATTTTCAAC	104798/ 133851	63,3
71 PE1 <i>AtRRN18</i>	TAGCATTTCATCGATCACGGC	Zk Chr. II/ IV	62,1
72 PE2 <i>AtRRN18</i>	CATATGACTACTGGCAGGATCAACC	Zk Chr. II/ IV	63,0
105 PE3 <i>AtRRN18</i>	GCCATTTCGAGTTTCACAGTC	Zk Chr. II/ IV	63,1
106 PE4 <i>AtRRN18</i>	CTACGGTTATCCGAGTAGTAGTTACCA	Zk Chr. II/ IV	60,2
107 PE5 <i>AtRRN18</i>	ATCAGAGCAAGCCAGAGCCC	Zk Chr. II/ IV	64,2
108 PE6 <i>AtRRN18</i>	CGTTCATACTTACACATGCATGGCTTA	Zk Chr. II/ IV	65,1

167 PE1 <i>Atycf1</i>	GTCCCGCAATAAAACCTGTTG	109618	61,6
168 PE2 <i>Atycf1</i>	CTCGGTGTAGGTTCCGGGATAATC	108851	63,0
169 PE3 <i>Atycf1</i>	CCTCCCCTACAGTATCGTCACC	108039	62,0
170 PE4 <i>Atycf1</i>	CAAACCTTCCCGTCGATGTG	107202	63,7
187 PE5 <i>Atycf1</i>	CAATGCTCTAACGCCACAC	107346	61,6
188 PE6 <i>Atycf1</i>	ATCGAATTGATCAGGTCATGTAGG	107731	61,4
198 PE7 <i>Atycf1</i>	ACCGAATTTATTATCTTCATGCATAAGG	109472	62,6
199 PE8 <i>Atycf1</i>	CACAAACCTCCCTTTTTTCTTTTCTA	109407	62,1
161 PE1 <i>Atycf2</i>	GTTGAACCTGTGAATTGCG	86682	61,5
162 PE2 <i>Atycf2</i>	TCTCATACACTATGGGGATGGTG	85574	61,0
163 PE3 <i>Atycf2</i>	AGTTTGGGTAGAGCCGGATC	84558	60,5
164 PE4 <i>Atycf2</i>	TAGTGGAGGCCTATGGGACAAA	83494	62,9
165 PE5 <i>Atycf2</i>	GGTAATCGAAAAGTATGCGGATTC	82422	62,1
166 PE6 <i>Atycf2</i>	CGCAATGACACGAAATGTACG	81441	62,4
181 PE7 <i>Atycf2</i>	ACGAGGATCCCCACTAAGCA	86402	61,9
182 PE8 <i>Atycf2</i>	TTCGGTTATTGGGGAAAAATCA	86103	62,5
183 PE9 <i>Atycf2</i>	CAATGGAGCCGTAGACAGTCAA	85802	62,5
184 PE10 <i>Atycf2</i>	GGATAGACCTCAACAGAAAACTGAA	85352	60,1
185 PE11 <i>Atycf2</i>	CCCGGGGAAAAATAGAGATGTC	85116	63,0
186 PE12 <i>Atycf2</i>	ACTCATTGCTTCACATTATCTGGA	82539	60,0
189 PE13 <i>Atycf2</i>	TCATCGACTCCCCGGAAG	85988	63,5
190 PE14 <i>Atycf2</i>	ACCGGGTTATTCTATTCCACCTC	85904	61,6
191 PE15 <i>Atycf2</i>	ATTACCGCAAGGCATAGAGGG	85705	62,5
192 PE16 <i>Atycf2</i>	GGGAAATGCCCTACCTTTGAG	85472	62,2
193 PE17 <i>Atycf2</i>	AGGCGAATTGAAAGCTAAGCA	85157	61,3
194 PE18 <i>Atycf2</i>	TGGAGAAGACAAAATTGTTTCAAGC	85255	62,5
195 PE19 <i>Atycf2</i>	TGACGGAACGGGAAGACCTA	85007	62,9
196 PE20 <i>Atycf2</i>	AGTTATTCGGCAGATTTTGATTCTT	84965	62,4

II.2.9.2 Primer Extension Reaktion

Für die *Primer Extension* Reaktion wurden je nach erwarteter Signalstärke 5-15 µg Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Die Hybridisierung von 0,6 pmol γ -³²P-ATP-endmarkiertem Oligonukleotid an die RNA erfolgte in 1x Hybridisierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 15-35 µl. Dafür wurde das RNA-Oligonukleotid-Gemisch für 5 min bei 85°C erhitzt und für 3 h bei 42°C in einem inkubiert. Dem folgte eine Fällung mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,6 Volumina 96 %igem (v/v) Ethanol ü. N. bei -20°C. Das gewonnene RNA-Oligonukleotid-Pellet wurde mit 80 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend für 2h bei 50°C im Inkubator für die cDNA-Synthese im *First-Strand* Puffer (Invitrogen) mit 100 nmol DTT, 1 µg Actinomycin D (Roth), 24 U *RiboLock*TM (Fermentas), je 20 nmol dNTPs und 200 U *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) in 20 µl Gesamtvolumen inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt. Dem folgte ein RNase-Verdau durch 5 ng RNase A für 30 min bei 37°C. Die synthetisierte cDNA wurde mit 7,5 Volumina 1x TEN und 25 Volumina 96 %igem (v/v) Ethanol ü. N. bei -20°C gefällt. Das präzipitierte Pellet wurde mit 80 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet, in 5 µl Ladepuffer aufgenommen und im denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. II.2.3.3).

10X TEN: 0,1 M Tris, pH 7,6; 10 mM EDTA; 1 M NaCl
 Ladepuffer: 96 % (v/v) Formamid; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 0,02 % (w/v) Xylencyanol

II.2.9.3 Radioaktive Sequenzierung von DNA

Für das *Fast Sequencing* wurden 2 µg Plasmid-DNA (vergl. Tab. 2 und II.2.1.2) mit 100 nmol NaOH in 4 µl Reaktionsvolumen für 5 min bei 37°C denaturiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des *DNA Sequencing Kits* (USB) nach Herstellervorgaben durchgeführt. Die Produkte wurden im denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. II.2.3.3).

II.2.10 5'-RACE Analyse von RNA

Die Kartierung der primären 5'-Enden plastidärer Transkripte von *Arabidopsis thaliana* wurde mittels der 5'-RACE Methode (Bensing et al., 1996; Abb. 2) mit folgenden Veränderungen durchgeführt. Die Reaktion erfolgte aus 5 µg Gesamt-RNA. Die 7-Methylguanosin-Kappe der primären Transkripte wurde unter Verwendung von 10 U *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP, Epicentre) in Gegenwart von 40 U RNase-Inhibitors *RiboLockTM* (Fermentas) im entsprechenden Puffer für 1 h bei 37°C entfernt. Dabei blieben phosphorylierte 5'-Enden der mRNA zurück. Im Kontrollversuch wurden die Transkripte nicht mit der TAP behandelt. Die RNA wurde extrahiert mit Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1), durch Zugabe von 3 Volumina 96 %igem (v/v) Ethanol/3 M NaOAc, pH 5,2 (30:1) aus der wässrigen Phase präzipitiert, mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und im Reinstwasser aufgenommen. Im Anschluss folgte die Ligation von 10 pmol 5'-RNA-Oligonukleotid wahlweise heswa-001 (Argaman et al., 2001) oder RUMSH (Metabion, Tab. 6) an die mit und ohne TAP behandelten Transkripte für 1 h bei 37°C mit 50 U T4 RNA-Ligase (Epicentre) in Gegenwart von 100 nmol ATP und 80 U *RiboLockTM* (Fermentas) im entsprechenden Puffer. Im Kontrollversuch wurde kein 5'-RNA-Linker zugegeben. Die RNA wurde erneut mit Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, durch Zugabe von 3 Volumina 96 %igem (v/v) Ethanol/3 M NaOAc, pH 5,2 (30:1) aus der wässrigen Phase präzipitiert, mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, in Reinstwasser aufgenommen und für die cDNA-Synthese eingesetzt. cDNAs wurden durch Zugabe von bis zu 7 genspezifischen Oligonukleotiden mit Hilfe der *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) nach Herstellervorgaben für 2 h bei 50°C synthetisiert. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 2,5 U RNase H (Fermentas) für 20 min bei 37°C spezifisch degradiert und die cDNA mit Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, durch Zugabe von 3 Volumina 96 %igem (v/v) Ethanol/3 M NaOAc, pH 5,2 (30:1) aus der wässrigen Phase präzipitiert, mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und in Reinstwasser aufgenommen. Dem folgten zwei PCR-Amplifikationsrunden. Die erste PCR-Amplifikation erfolgte in *Taq*-Reaktionspuffer (Qiagen) aus 10 % cDNA mit je 10 pmol 5'-RNA-Linker-spezifischen Vorwärtsprimer (wahlweise je nach 5'-RNA-Linker: Oligonukleotid P1a oder 301 RUMSH1) und genspezifischen Rückwärtsprimer (Tab. 6), je 10 nmol dNTPs mit 1,25 U *Taq* DNA-Polymerase in 50 µl-Ansätzen unter folgenden Bedingungen: 94°C 3 min; 35 Zyklen: 94°C 30 sec, 55-63°C 30 sec, 72°C 1 min; 72°C 10 min. Die zweite Amplifikation wurde aus $\frac{1}{50}$ der ersten PCR mit je 10 pmol 5'-RNA-Linker-spezifischen Vorwärtsprimern (P1a oder 302 RUMSH2) und eines weiter stromaufwärts hybridisierenden genspezifischen Rückwärtsoligonukleotids (Tab. 6) unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Produkte gewünschter Größe wurden unter Verwendung des *Gel Extraction Kits* (Qiagen) extrahiert und in den Vektor

pDrive (Qiagen) ligiert. Die Ligationsprodukte wurden in chemisch kompetente *E. coli* Top 10 Zellen (Invitrogen) transformiert. Positive Klone wurden zur anschließenden Sequenzierung an Herrn Dr. M. Meixner (Kap. II.2.8.2) übergeben.

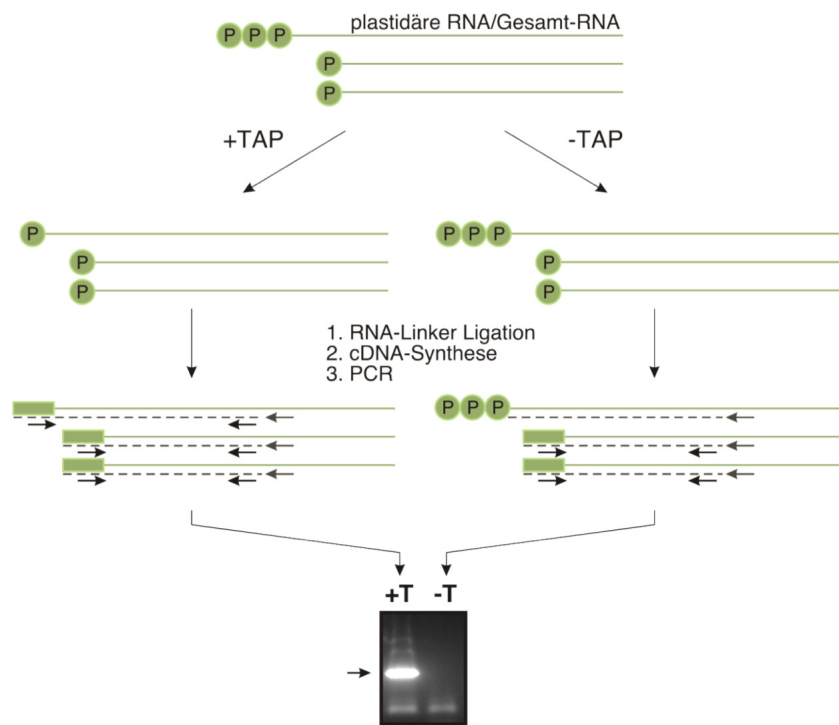


Abb. 5: 5'-RACE Methode zur Unterscheidung primärer von prozessierten Transkript-5'-Enden. Durch die Behandlung der RNA mit der *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) entstehen sekundäre RNA-5'-Enden (links), an welche RNA-Linker (grüne Boxen) ligiert werden. Revers transkribierte Produkte werden anschließend mittels PCR mit Gen- und Linker-spezifischen Primern (Pfeile) analysiert und ermöglichen eine Identifizierung primärer Transkripte (durch schwarzen Pfeil markierte Bande). Im Kontrollversuch werden die Transkripte nicht mit der TAP behandelt (rechts). Nach Bensing *et al.*, 1996.

Tab. 6: 5'-RNA-Linker und spezifische Oligonukleotide aus der 5'-RACE Analyse

5'-RNA-Linker	Sequenz (5'→3')			
heswa 001	5'-GAUAUGCGCGAAUUCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA-3'			
RUMSH	5'-GUGAUCCAACCGACGCGACAAGCUAAUGCAAGANNN-3'			
Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5'→3')			T _m [°C]
P1a	CGAATTCCTGTAGAACGAACACTAGAAG			63,6
301 RUMSH1	TGATCCAACCGACGCGAC			62,1
302 RUMSH2	ACCGACGCGACAAGCTAATGC			64,5
Primer	Gen/ RNA	Nukleotidsequenz (5'→3')	5'-Position in der DNA	T _m [°C]
P2 _{accD}	accD	ACTTAGCTCACCTCTGTATTCC	57140	54,1
P3 _{accD}		TGAACCACGATTTTTCCATAGAGC	57093	63,5
P4 _{accD}		TTCTGGCCTCTATTTAAATGAAAATACAATA	57069	62,4
P5 _{accD}		AGAGTAAGCAAAACATATCGATGCAA	56965	62,2
P6 _{accD}		AATCAATTTTAATTCTAAATGAAAAGAAGGATT	56906	62,8
P2 _{atpB}	atpB	ATGATTTGGGCGATACG	54077	54,8

269 P2 <i>AtatpBc</i>		AATATGTTAAATTTTGTTACGAAT	54166	51,5
P3 <i>atpB</i>		GTATCGAAACCTCTGGATTGGAAGTAGTAG	54114	62,8
270 P3 <i>AtatpBc</i>		GTAAGCACTCGATTTTCGTTGGTCC	54253	65,2
P4 <i>atpB</i>		TGGATTTGAAGTAGTAGGATTTGTTCTCATAAT	54127	64,2
P5 <i>atpB</i>		AGTAAGCACTCGATTTTCGTTGGTC	54252	62,9
P6 <i>atpB</i>		GAATAGGCAAGCCTTTGTTTTATCTAGC	54428	63,6
P7 <i>atpB</i>		TTTGGATTTATAAAAAGTCAAAGATTCAAAC	54694	62,9
245 P2 <i>AtatpI</i>	<i>atpI</i>	TCTCATATAACCCTTCTTTTATTAGTG	14716	55,8
246 P3 <i>AtatpI</i>		GTTTTGGATCCCAACTAAACAAATCAC	14861	63,8
295 P3 <i>AtclpP</i>	<i>clpP</i>	GGAACGCCAATAGGCATGAAATG	71866	66,5
317 P2 <i>AtmatK</i>	<i>matK</i>	CTTCCAATAAACCCAGAGCCCAACCTT	2190	67,2
318 P3 <i>AtmatK</i>		TTCGATTTGAACTGAAGGTAAAGTCTT	3582	61,8
321 P2 <i>AtndhC</i>	<i>ndhC</i>	CTCCGGAATTAGAAATGCCAAAC	50276	64,8
322 P3 <i>AtndhC</i>		AATGCCAAACAGGAATAGCACTTG	50290	64,5
323 P4 <i>AtndhC</i>		TGATATTAGTAAAAATGCCCAGAAAATATC	50313	61,1
226 P2 <i>AtpsaA</i>	<i>psaA</i>	CCAAAGAAAGATGATAGAGAGTTG	41606	56,4
227 P3 <i>AtpsaA</i>		GGTTTAGCCCATTTCCTCGAAAG	41772	63,1
97 PE <i>Atpsba</i>	<i>psbA</i>	TCCAGTTACAGAAGCGACCCCATAG	1384	66,5
294 P3 <i>Atpsba</i>		TTCGCGTCTCTCTAAAATTGCAGTC	1418	65,0
331 P2 <i>Atpsbl</i>	<i>psbl</i>	CTGAGTGGACTAAAGCGTTGGATTG	7862	65,2
332 P3 <i>Atpsbl</i>		ACGAGTTAATCGTACCGAGGGTTC	7825	63,7
287 P2 <i>Atrpl23</i>	<i>rpl23</i>	TGGAATAGAATAACCCGGTTGAAGC	85886	65,2
288 P3 <i>Atrpl23</i>		ATTCTTTTAACCTTTCCGGGGAGTC	85959	64,6
220 P2 <i>Atrpl33</i>	<i>rpl33</i>	CACCTCAATCTTCTATTTTAATTTTAG	67463	55,6
221 P3 <i>Atrpl33</i>		TCGTTCTATTACTAATTTCAATTGGATCCTG	67228	63,6
256 P4 <i>Atrpl33</i>		TTTTAGGATCCAGAAAGAACAAGAAC	67442	60,3
247 P2 <i>AtrpoA</i>	<i>rpoA</i>	ATTTTCTTCCCTATGAGTTCTAGTC	86150/ 152499	55,7
248 P3 <i>AtrpoA</i>		ATGATATGAATATACCACACCAATTC	86210/ 152439	57,3
310 P4 <i>AtrpoA</i>		TGAGTTCTAGTCTCAATAAGAATGCTA	86163/ 152486	57,3
255 P2 <i>AtrpoBa</i>	<i>rpoB</i>	CTGATTAAATCCGGGTATTG	26279	54,1
258 P2 <i>AtrpoBd</i>		ATCTGATTAAATCCGGGTATT	26277	54,4
259 P2 <i>AtrpoBe</i>		TTCACCGAATCATATCCATAG	26388	55,1
260 P2 <i>AtrpoBf</i>		CAATTCGATTGCATACCATAA	26650	56,1
261 P3 <i>AtrpoBd</i>		CTCTTTTTCATCCCCAAGCATCTTT	26309	64,8
263 P3 <i>AtrpoBe</i>		TCGATCTAGCAATAATGGAATTTCTATTCT	26412	62,7
266 P3 <i>AtrpoBf</i>		TCATCATTTGGATCTGTTTCGAGCAG	26680	65,7
P4 <i>rpoB-a</i>		TTTTTGAAATTTCCCATTTATCCGTTTA	26332	63,5
262 P4 <i>AtrpoBd</i>		AAAAATCCCATCCCATTTCTCATTC	26363	64,3
264 P4 <i>AtrpoBe</i>		TTACTGAATCACATGAAATTTTATCCAACCTCCA	26444	68,1
P5 <i>rpoB</i>		TTCATTGTTCAAACAAATATTTGCAGAA	26776	63,7
265 P5 <i>AtrpoBe</i>		TTGAGAAATACCGCTGGAACCTTACG	26564	64,6
244 P7 <i>AtrpoB</i>		TGTATTCATCATTTGGATCTGTTTCGAG	26675	63,4
238 P2 <i>Atrps2</i>	<i>rps2</i>	AATTAAGAATTGTTTTCCCCTAC	15505	54,9
239 P3 <i>Atrps2</i>		TTTGCAGAAATATAAGGTGCCATTC	15611	62,4
242 P2 <i>Atrps4</i>	<i>rps4</i>	TACGACCATTAACCTAAAATATGTCC	45465	55,7
243 P3 <i>Atrps4</i>		GCCCTCGGTAACGTGACATAAAG	45810	63,9
293 P3 <i>Atrps8</i>	<i>rps8</i>	CAATGGTGTCTTTCCCCATGATAAG	80454	64,6
240 P2 <i>Atrps15</i>	<i>rps15</i>	ATAAATAATCTTTTCTGTGCAATTC	123424	55,2
241 P3 <i>Atrps15</i>		ATCCCCCTGCTTTCTCTTTTGTTC	123508	64,0
257 P4 <i>Atrps15</i>		TCCTTCCCCTTTTAATATGAATTGAAAGATAT	123572	64,7
228 P2 <i>Atrps16</i>	<i>rps16</i>	TTCTATACAAAGAATCATACAAACG	5769	54,7
237 P3 <i>Atrps16</i>		TGTCGAGCCAAGAGCACCTATATTC	6055	64,8
222 P2 <i>Atrps18</i>	<i>rps18</i>	TCGCTTGGATTTAGTAAAAAG	67955	54,2
223 P3 <i>Atrps18</i>		TCCTTATCTCTAAAATCCTATTTTGATCG	67901	61,4
P2 <i>rrn16-a</i>	<i>rrn16</i>	ATTAGCAGCCGTTTCCAG	101168/ 137481	56,1
P2 <i>rrn16-b</i>		CTCCATGAGATTCATAGTTGC	101021/ 137628	54,5
P3 <i>rrn16-a</i>		TCGAACTCTCCATGAGATTCATAGTTG	101028/ 137621	63,9
P4 <i>rrn16</i>		TAGTTGCATTACTTATAGCTTCCTTCTTCG	100978/ 137642	63,3

P5rrn16		CGTAGACAAAGCTGATTCGGAATTG	100979/ 137670	65,1
309 P2AttrnA	trnA-	CGTAGTTCCTACGGGGTGGAGAC	104100/ 134549	65,2
416 P2bAttrnA	UGC	TGGAGATAAGCGGACTCGAAC	104538/ 134111	61,6
311 P3AttrnA		AATTAGACACCCAACCCGTAATC	103737/ 134912	60,3
312 P3bAttrnA		AGTTGGTAGAGCTCCGCTCTTGC	103678/ 134971	65,4
297 P2AttrnC	trnC-	ATTTGAACTGGGGAAAAAGGATTTG	27430	64,3
300 P2aAttrnC	GCA	ATGTCTGAGCATTCCGAGACTTTC	27744	63,1
298 P3AttrnC		GGAAAAAGGATTTGCAGTC	27419	54,8
303 P3aAttrnC		CGAGCCAGGGGCTTAGAATAATG	27520	65,1
299 P3bAttrnC		ATGGCCGAGTGGTAAAGCG	27379	65,6
283 P2AttrnE	trnE-	GCTGCCTCCTTGAAAGAGAGATG	30491	63,8
284 P3AttrnE	UUC	GATGTCCTGAACCACTAGACGATGG	30510	65,2
281 P2AttrnFM	trnFM-	CAAGGTTATGAGCCTTGCGAGCTAC	36734	66,2
282 P3AttrnFM	CAU	GCTCTACCCCGCGCTGAAAC	36765	66,4
Ath trnGGlyrev	trnG-	GGCGGATAGCGGGAATCGAACCCGCGTCTT	36560	84,3
296 P3AttrnG	GCC	CAAGGAGAAATTTTACCATTTCGAC	36522	60,2
285 P2AttrnG	trnG-	TTCAAAACCGAACATGAAACTTTGG	9335	65,1
413 P2bAttrnG	UCC	GGTAGCGGGAATCGAACCC	9427	60,4
286 P3AttrnG		TCGGAAGATTAATCAAACCGAGAGAC	8732	64,8
313 P2AttrnI	trnI-	TTATTTTCCCATTTGAGGCCGAAC	103180/ 135469	65,2
417 P2bAttrnI	GAU	TGGGCCATCCTGGATTTG	103601/ 135048	62,8
314 P3AttrnI		AGGCACAACGACGCAATTATCAG	102853/ 135796	65,5
329 P2AttrnL	trnL-	TCAATATTATGCCTTGAAAGAGGACTCG	94267/ 144382	64,7
330 P3AttrnL	CAA	ACGCTCTTTAGCACGAGATTTTGAGTC	94301/ 144348	66,0
279 P2AttrnL	trnL-	GGTCGTCATTTTTGAGATCGTTTTG	47232	64,8
414 P2bAttrnL	UAA	GATAGAGGGACTTGAACCCTCAC	47486	60,3
280 P3AttrnL		GGCTCAATCCAATTAAGTCCGTAGC	46942	65,0
315 P2AttrnK	trnK-	AAGCGAATCCACATACATAGAAATAG	1633	59,1
316 P3AttrnK	UUU	GGACTCGAACCCGGAAGT	1728	61,8
324 P4AttrnK		GGATCAGTCGTGGTCTTACAAACTCTA	4226	63,0
325 P5AttrnK		AGTACTCTACCGTTGAGTTAGCAACCC	4321	63,2
277 P2AttrnM	trnM-	ATTGGATTTGAACCAATGACTCCTG	52120	64,4
278 P3AttrnM	CAU	CTCCTGCCGTATGAAAGCAATACTC	52101	64,3
326 P2AttrnR	trnR-	TATTGCGTCCAATAGGATTTGAACC	9664	64,2
327 P3AttrnR	UCU	CCAAAGGTTTAGAAGACCTATGTCCTATCC	9635	65,1
328 P4AttrnR		GGTTTAGAAGACCTATGTCCTATCCATTAG	9630	62,0
319 P2AttrnS	trnS-	TGTGGTCAATCACGTAAGATTGGTG	44953	65,2
320 P3AttrnS	GGA	AGTTCCAATGTTACGCCTTCAAC	44866	61,6
306 P2AttrnT	trnT-	CGGATTTGAACCGATGACTTACG	31430	64,8
308 P2aAttrnT	GGU	TATATTTGGCGATTCAAGAGACG	31655	60,4
307 P3AttrnT		ACCATGGCGTTACTCTACCACTG	31403	62,5
275 P2AttrnV	trnV-	AAGGGTTCTCTTGACGTAGGTTTGC	51454	64,9
415 P2bAttrnV	UAC	TATACGGACTCGAACCGTAGACC	51205	61,5
276 P3AttrnV		AGGACCTAATGTCAGGCTGTTGTTC	51700	63,9
212 P2-Atycf1	ycf1	GTCTACCCAATGCTAAATGC	109675/ 128974	54,9
213 P3-Atycf1		GGGCCCTATGGAAAATGTGG	109524/ 129125	63,5
214 P2a-Atycf2	ycf2	AGGCGAATTGAAAGCTAAG	85157/ 153492	54,9
216 P2b-Atycf2		ATACATAACGAATTGGTGTGG	86244/ 152405	54,9
218 P2c-Atycf2		GGTCATAAGCGTCTATACCG	85681/ 152968	54,9
215 P3a-Atycf2		CCCCCGGGGAAAAATAGAG	85118/ 153531	62,7
217 P3b-Atycf2		TCATAACATATGAACAGTAAGAAGTACGATTC	86213/ 152436	61,4
219 P3c-Atycf2		TGGGAAATGCCCTACCTTTG	85473/ 153176	62,0
289 P2Atycf4	ycf4	AAGAGACCTGCGATCCCATAGAAAG	59995	65,0
290 P3Atycf4		AATGATTTGCTGGGACGGAAATAAC	59945	65,1
304 P2Atycf6	ycf6	TCCACTTCTTCCCCACACTACG	28172	63,6
305 P3Atycf6		TTAAAGCAGCCCATGCGAGAC	28122	64,7

II.2.11 Northern Blot Analyse

II.2.11.1 Herstellung und Markierung von DNA-Sonden

Für den spezifischen Nachweis von Transkriptmengen wurden doppelsträngige DNA-Fragmente aus genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* mittels PCR (Kap. II.2.6) amplifiziert. 100 ng DNA wurden anschließend unter Einsatz von 50 μCi α - ^{32}P -dCTP durch *Random Priming* unter Verwendung des HexaLabelTM DNA Labeling Kits (Fermentas) nach Herstellervorgaben markiert und mittels QIAquick® Nucleotide Removal Kits (Qiagen) von freien Nukleotiden getrennt. Die dafür eingesetzten Oligonukleotide sind Tabelle 7 zu entnehmen.

II.2.11.2 Detektion von RNA

Die Nylonmembran mit elektrophoretisch aufgetrennter (Kap. II.2.3.2) und kovalent gebundener RNA (Kap. II.2.4.1) wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen für 2-3 h bei 55°C im Hybridisierungssofen in der Hybridisierungslösung und zum Nachweis gebundener RNA bei entsprechender Temperatur mit der α - ^{32}P -markierten DNA-Sonde (Kap. II.2.11.1) ü. N. inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 1 min bei RT in 2x SSC gespült und zur Entfernung unspezifischer Bindungen jeweils zweifach für 15 min mit abnehmender Salzkonzentration mit Waschlösung I und II gewaschen, in Klarsichtfolie eingeschlagen und ü. N. bei RT auf *Imaging Screen K-Type* (BioRad) exponiert. Die Visualisierung und Auswertung erfolgte mit der Software *QuantityOne*®, Version 4.6.2 (BioRad).

10x SSC	0,15 M Natriumcitrat; 1,5 M NaCl; pH 7,0
Hybridisierungslsg.	50 % (v/v) deionisiertes Formamid; 250 mM NaCl; 7 % (w/v) SDS; 120 mM Na [PO ₄], pH 7,0
Waschlsg. I	2x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
Waschlsg. II	0,1x SSC; 0,1 % (w/v) SDS

Tab. 7: Für die Northern Blot Analyse eingesetzte Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5'→3')	5'-Position in der DNA	T _m [°C]
73 5' <i>AtpsbA</i>	TACATTGGTTGACATGGCTAT	1567	55,2
74 3' <i>AtpsbA</i>	ATCCAGTTACAGAAGCGACC	1383	56,5
75 5' <i>AtrbcL/atpB</i>	GATTTGGGCGATACGTC	54079	54,3
76 3' <i>AtrbcL/atpB</i>	GAGGAGTTACTCGGAATGC	55090	54,4
77 5' <i>AtclpP</i>	GAAATCCCATATAGCCCG	71774	55,4
78 3' <i>AtclpP</i>	CCGGTTAGTCCATAAGGG	72897	55,1
79 5' <i>Atrrn16</i>	TCTCCTACCCGTATCGAATAG	100405	55,7
80 3' <i>Atrrn16</i>	CACTTCCCGTCCGACT	101087	54,7
81 5' <i>AtrpoB</i>	GATTAAATCCGGGTATTGC	26281	54,2
82 3' <i>AtrpoB</i>	GAACATAATTAGTAGTGGCAAGTAAAG	27626	55,6
83 5' <i>AtaccD</i>	CCGTAGCCAACCGAGTAG	56207	56,5
84 3' <i>AtaccD</i>	CGATATGAAATTGCGAATGTC	57314	57,9
25 5' <i>At18S</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	Zk Chr. II/ IV	57,3
26 3' <i>At18S</i>	ACTCGAAAGAGCCCGGTATT	Zk Chr. II/ IV	57,3

II.2.12 Analyse der *run-on* Transkription

II.2.12.1 Isolation von Plastiden

Alle Arbeitsschritte der Plastidenextraktion wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Isolation von Chloroplasten wurde grünes Blattgewebe von *Arabidopsis thaliana* verwendet (Klein und Mullet, 1987; Kulaeva et al., 2000). Mindestens 20 g Blatt- oder Keimlingsfrischgewicht wurden mit 150-200 ml eiskaltem 1x Isolationspuffer im Mischer *Warringblender MX 32* (Braun) homogenisiert, durch drei Lagen *Miracloth* (Calbiochem) filtriert und für 3 min bei 4°C und 2000xg pelletiert. Anschließend wurde das grüne Chloroplastenpellet mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig in 1 ml 1x Isolationspuffer resuspendiert und auf einen 30-80 % (grüne Keimlinge) oder 40-70 % (grünes Blattgewebe) Percollgradienten geschichtet. Dem folgte eine Zentrifugation in einem *swing-out*-Rotor und der RC6-Zentrifuge (Sorvall®) für 20 min bei 4°C und 6500xg. Die intakten Chloroplasten wurden in ein neues Röhrchen überführt, mit 1x Isolationspuffer verdünnt und für 3 min bei 4°C und 2000xg erneut pelletiert. Das Pellet wurde mit 100 µl 1x Isolationspuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer (Roth) wurde aus einer Verdünnung der Suspension die Chloroplastenzahl bestimmt.

5x Isolationspuffer	1,75 M D-Sorbitol; 10 mM EDTA, pH 8,0; 125 mM HEPES, pH 7,6
1x Isolationspuffer	Fünffache Verdünnung 5x Isolationspuffer mit 0,4 mM Na-Isoascorbat
Percollpuffer	0,3 M D-Sorbitol; 1,6 mM EDTA, pH 8,0; 50 mM Tricin-NaOH, pH 8,0; 6 mM β-Mercaptoethanol; 3 % PEG 8000; 0,5 % BSA; 0,5 % Ficoll
30 % Percollgradient	2,25 ml Percoll (GE Healthcare); 5,25 ml Percollpuffer
80 % Percollgradient	6 ml Percoll; 1,5 ml Percollpuffer
40 % Percollgradient	3 ml Percoll; 4,5 ml Percollpuffer
70 % Percollgradient	5,25 ml Percoll; 2,25 ml Percollpuffer

Zur Isolation von Plastiden aus weißem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* wurde das Protokoll zur Extraktion von Plastiden aus der Erbsenwurzel (Emes und England, 1986) verändert eingesetzt. Mindestens 20 g weiße, auf SEA-Medium mit 500 mg/l Spectinomycin angezogene Keimlinge wurden mit 2 Volumina eiskaltem Puffer A in einem Mörser homogenisiert, durch sechs Schichten *Miracloth* (Calbiochem) gefiltert und für 3 min bei 4°C und 2000xg zentrifugiert. 10-15 ml große Portionen des Überstandes wurden mit Hilfe einer Spritze mit entsprechend langer Kanüle in neuen Röhrchen mit jeweils 10 ml Puffer B unterschichtet und für 5 min bei 4°C und 4000xg in einem *swing-out*-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen Puffer A aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plastidenzahl bestimmt.

Puffer A	330 mM D-Sorbitol; 50 mM Tricin-NaOH, pH 7,9; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 mM MgCl ₂ ; 0,1 % BSA
Puffer B	330 mM D-Sorbitol; 50 mM Tricine-NaOH, pH 7,9; 0,1 % BSA; 10 % (v/v) Percoll

II.2.12.2 *Run-on* Transkription

Für die Analyse der *run-on* Transkription wurden jeweils $1,5-5 \times 10^7$ Plastiden aus grünem und weißem Blattgewebe für 3 min bei 4°C und 1000xg pelletiert und vorsichtig in 45 µl Puffer D aufgenommen. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 50 µl frischer Transkriptionslösung in Gegenwart von 40 U *RiboLock*TM (Fermentas) und 50 µCi α -³²P-UTP (Perkin Elmer) für 15 min bei 25°C inkubiert und anschließend mit 100 µl Stopplösung auf Eis gestoppt. Die Transkripte wurden zunächst mit Phenol und dann mit Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, durch Zugabe von 3 Volumina 96 %igem (v/v) Ethanol/3 M NaOAc, pH 5,2 (30:1) aus der wässrigen Phase präzipitiert, mit 80 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und in Reinstwasser aufgenommen.

Puffer D	50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM KCl; 3 mM β -Mercaptoethanol
Transkriptionslsg.	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM ATP; 0,2 mM CTP; 0,2 mM GTP; 0,01 mM UTP; 10 mM β -Mercaptoethanol
Stopplsg.	5 % Natrium-Laurylsarkosinat; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA, pH 8,0

II.2.12.3 Hybridisierung und Detektion der *run-on* Transkripte

Für den spezifischen Nachweis von Transkripten wurden doppelsträngige DNA-Fragmente aus 100 ng genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* mittels PCR (Kap. II.2.6) amplifiziert, elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. II.2.3.1) und aus der Gelmatrix extrahiert. Für Gene mit Intronen wurden zusätzlich PCR-Fragmente aus Gesamt-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* hergestellt. Die dafür eingesetzten Oligonukleotide sind Tabelle 8 zu entnehmen. Der Transfer der DNA-Fragmente auf die Membran erfolgte wie im Kap. II.2.4.2 beschrieben. Die schematische Anordnung der genspezifischen Produkte ist Abbildung 6 zu entnehmen. Die für 5 min mit 2x SSC gewaschene Membran wurde zur Absättigung freier Bindungsstellen in 10 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung für 1-4 h bei 58°C im Hybridisierungs-Ofen prähybridisiert und zum Nachweis gebundener DNA bei entsprechender Temperatur in frischer Hybridisierungslösung mit α -³²P-markierten Transkripten (Kap. II.2.11.2) ü. N. inkubiert.

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zur Entfernung unspezifischer Bindungen zweifach in Waschlösung I und einfach in Waschlösung II für jeweils 7 min bei 58°C gewaschen. Im Anschluss wurde die in Klarsichtfolie eingeschlagene Membran ü. N. auf *K-Type Imaging Screens* bei RT exponiert. Die Auswertung erfolgte wie in Kap. II.2.3.3 beschrieben.

Um die an die Membran hybridisierten Sonden wieder zu lösen, wurde die Membran zweifach für jeweils 10 min in kochender *Stripping*-Lösung inkubiert. Im Anschluss konnte die Membran mit neuer Sonde hybridisiert werden.

10x SSC	0,15 M Natriumcitrat; 1,5 M NaCl; pH 7,0
Hybridisierungslsg.	250 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2; 7 % (w/v) SDS; 2,5 mM EDTA, pH 8,0
Waschlsg. I	0,5x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
Waschlsg. II	0,2x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
<i>Stripping</i> -Lsg.	5 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % (w/v) SDS

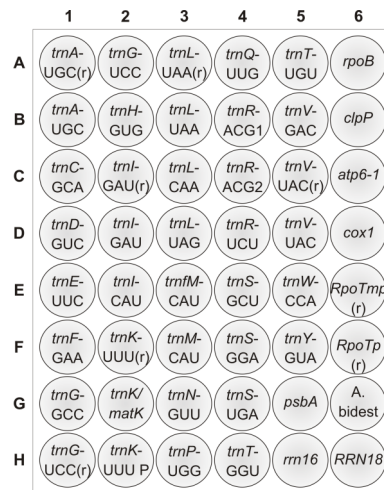


Abb. 6: Schematische Anordnung genspezifischer Produkte aus *Arabidopsis thaliana* auf die *Dot Blot*-Membran. Fragmente repräsentieren plastidäre tRNA-Gene und ausgewählte Kontrollen. Sie wurden individuell aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert und unter Vakuum auf eine Nylonmembran transferiert und durch UV fixiert. Für Gene mit Intronen wurden zusätzlich PCR-Produkte aus Gesamt-cDNA generiert, um auch das reife Transkript (r) erfassen zu können. Für *trnK* wurde auch ein Teil des Promotorbereichs amplifiziert (P).

Tab. 8: Für die *Dot Blot* Analyse eingesetzte Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5'→3')	5'-Position in der DNA	T _m [°C]
333 5' <i>AttrnH</i> -GUG	GAACGACGGGAATTGAACC	7	60,3
334 3' <i>AttrnH</i> -GUG	CGGATGTAGCCAAGTGGATT	75	59,6
335 5' <i>AttrnK</i> -UUU r	GGGTTGCTAACTCAACGGTAG	4347	58,8
336 3' <i>AttrnK</i> -UUU r	ACTCGAACCCGGAAGTAGTC	1730	58,3
337 5' <i>AttrnK</i> -UUUpr	TATTTATCCCTGACGCACACAC	4436	59,8
338 3' <i>AttrnK</i> -UUUpr	AAAGCCGAGTACTCTACCGTTG	4314	59,8
339 5' <i>AttrnK</i> -UUU/matK	TATGGTTTCAATCGCAAAAGG	2642	59,9
340 3' <i>AttrnK</i> -UUU/matK	GGTTGCTTTACTAATGGGATGC	2396	59,8
341 5' <i>AttrnQ</i> -UUG	GCGTAGCCAAGCGGTAAG	6683	59,6
342 3' <i>AttrnQ</i> -UUG	GGACGGAAGGATTCGAAC	6619	58,0
343 5' <i>AttrnS</i> -GCU	GAGAGATGGCTGAGTGGACT	7871	56,9
344 3' <i>AttrnS</i> -GCU	GAACCCTCGGTACGATTAAGT	7802	57,2
345 5' <i>AttrnG</i> -UCC r	GCGGGTATAGTTTATGTTGTA	8646	53,8
346 3' <i>AttrnG</i> -UCC r	CGCATCGTTAGCTTGG	9409	54,6
347 5' <i>AttrnG</i> -UCC	GAGTTGGCCCGATCTATCTTC	9142	60,0
348 3' <i>AttrnG</i> -UCC	TCATTCGGCTCCTTTATGATG	9308	60,0
349 5' <i>AttrnR</i> -UCU	CATTGTCTAATGGATAGGACA	9595	52,7
350 3' <i>AttrnR</i> -UCU	GGATTTGAACCTATACCAAAG	9650	53,1
351 5' <i>AttrnC</i> -GCA	GAGTGGTAAGGCGGGGGACT	27385	64,8
352 3' <i>AttrnC</i> -GCA	CCGGATTTGAACTGGGGAAAA	27434	65,2
353 5' <i>AttrnD</i> -GUC	GTTCAATTGGTCAGAGCACCG	29865	62,9
354 3' <i>AttrnD</i> -GUC	CGCAGCTTCCGCCTTG	29823	62,9
355 5' <i>AttrnY</i> -GUA	CGGTTAATGGGGACGGAC	30391	61,1
356 3' <i>AttrnY</i> -GUA	AACCAGCGTAGACATATTGCC	30341	59,1
357 5' <i>AttrnE</i> -UUC	GCCCCATCGTCTAGTGGTTC	30538	65,1
358 3' <i>AttrnE</i> -UUC	GTCGAATCCCCGCTGCC	30480	65,2
359 5' <i>AttrnT</i> -GGU	CCCTTTAACTCAGTGGTAGA	31370	53,8
360 3' <i>AttrnT</i> -GGU	GATTTGAACCGATGACTTAC	31428	52,1

361 5' <i>AttrnS</i> -UGA	CGAACCCTCGATAGTTATTT	35328	53,7
362 3' <i>AttrnS</i> -UGA	GGTCTTGAAAACCGGTATAG	35374	53,9
363 5' <i>AttrnG</i> -GCC	GGATAGCGGGAATCGAAC	36557	58,0
364 3' <i>AttrnG</i> -GCC	TGGTAAAATTTCTCCTTGCCA	36505	59,6
365 5' <i>AttrnfM</i> -CAU	CAGTTTGGTAGCTCGCAAGG	36765	61,0
366 3' <i>AttrnfM</i> -CAU	GACAGGATTTGAACCCGTGAC	36711	61,7
367 5' <i>AttrnS</i> -GGA	GGCCGAGTGGTTGAAG	44835	55,8
368 3' <i>AttrnS</i> -GGA	CCCTCGGTAAACAAAAGTCTA	44893	56,1
369 5' <i>AttrnT</i> -UGU	CCGCTTAGCTCAGAGGTTA	46283	55,9
370 3' <i>AttrnT</i> -UGU	GATGACCATCGCATTACAAAT	46235	57,4
371 5' <i>AttrnL</i> -UAA r	GATATGGCGGAATTGGTAGA	46897	57,5
372 3' <i>AttrnL</i> -UAA r	CACGATTTTAAAAGTCAACGG	47466	57,4
373 5' <i>AttrnL</i> -UAA	GTGCAGAGACTCAATGGAAGC	47074	60,0
374 3' <i>AttrnL</i> -UAA	AGGTCGTCATTTTGGATCG	47233	59,1
375 5' <i>AttrnF</i> -GAA	CGGGATAGCTCAGTTGGTAGA	48177	59,3
376 3' <i>AttrnF</i> -GAA	CAGATTTGAACTGGTGACACG	48237	59,2
377 5' <i>AttrnV</i> -UAC r	GGGCTATAGCTCAGTTAGGTA	51870	53,2
378 3' <i>AttrnV</i> -UAC r	GACCTGCTCGGTGTAAA	51224	52,7
379 5' <i>AttrnV</i> -UAC	TACCCCGTTAGGTAGGGAATG	51692	60,0
380 3' <i>AttrnV</i> -UAC	TTGACGTAGGTTTGCTTTTGG	51464	60,1
381 5' <i>AttrnM</i> -CAU	ACTCAGTGGTTAGAGTATTGC	52065	51,2
382 3' <i>AttrnM</i> -CAU	TTTGAACCAATGACTCCT	52114	51,0
383 5' <i>AttrnW</i> -CCA	AGTTCGGTAGAACGTGGGTC	66289	59,1
384 3' <i>AttrnW</i> -CCA	ATTTGAACCTACGACATTGGG	66242	58,8
385 5' <i>AttrnP</i> -UGG	GGATGTAGCGCAGCTTG GTA	66561	61,3
386 3' <i>AttrnP</i> -UGG	GACAGGATTTGAACCCGTGAC	66497	61,7
387 5' <i>AttrnL</i> -CAU	GAATGGTTAAAGCGCCCAAC	86373/ 152276	61,7
388 3' <i>AttrnL</i> -CAU	TGAACCTACGAATTCGCCAAT	86328/ 152321	61,7
389 5' <i>AttrnL</i> -CAA	GCCGCTATGGTGAAATTGGTA	114270	62,1
390 3' <i>AttrnL</i> -CAA	CGAACCGAGATGCTCTAGCAC	114333	62,4
391 5' <i>AttrnV</i> -GAC	AGGGATATAACTCAGCGGTAG	100709/ 137940	55,2
392 3' <i>AttrnV</i> -GAC	GGCTCGAACTGATGACTTC	100768/ 137881	55,8
393 5' <i>AttrnI</i> -GAU r	GGGCTATTAGCTCAGTGGTAG	102801/ 135848	55,2
394 3' <i>AttrnI</i> -GAU r	CCATCCTGGATTTTATCAG	103597/ 135052	54,7
395 5' <i>AttrnI</i> -GAU	AGATCACCCCTTTCATTCTGG	103224/ 135425	60,3
396 3' <i>AttrnI</i> -GAU	GCTCTCCAAGTGTGCTTGTTT	103453/ 135196	60,0
397 5' <i>AttrnA</i> -UGC r	GGGGATATAGCTCAGTTGGTA	103665/ 134984	55,9
398 3' <i>AttrnA</i> -UGC r	ATCCGCCTTGCAAGAG	104510/ 134139	55,6
399 5' <i>AttrnA</i> -UGC	CTGAGACAAAGATGGGCTGTC	103835/ 134814	59,8
400 3' <i>AttrnA</i> -UGC	GGGAGATAGTGCATCAAGCTG	104019/ 134630	59,8
401 5' <i>AttrnR</i> -ACG1	GGGCTTGTAGCTCAGAGGATT	108302/ 130347	59,9
402 3' <i>AttrnR</i> -ACG1	CGACACCGTGGTTTCGTAG	108351/ 130298	58,6
403 5' <i>AttrnN</i> -GUU	CCTCAGTAGCTCAGTGGTAGAGC	109083/ 129566	59,7
404 3' <i>AttrnN</i> -GUU	CCTACGACCAATCAGTTAACAGC	109033/ 129616	60,1
405 5' <i>AttrnL</i> -UAG	CGCTATGGTGAAATTGGTA	114272	54,7
406 3' <i>AttrnL</i> -UAG	GCTCTAGCACTGCTTCCTAAG	114322	56,3
407 5' <i>AttrnR</i> -ACG2	GGGCTTGTAGCTCAGAGGATTA	108302/ 130347	59,9
408 3' <i>AttrnR</i> -ACG2	TAGCCACGTGCTCTAATCCTC	108336/ 130313	59,5
409 5' <i>AttrnL</i> -CAA	GGTGGTGAAATGGTAGACACG	94351/ 144298	60,2
410 3' <i>AttrnL</i> -CAA	AACCTCCACGCTCTTTAGCAC	94294/ 144355	60,8
47 <i>AtpsbA</i>	ACTTCTGTTTTTATTATCGCATTTCATTG	1312	61,8
48 <i>AtpsbA</i>	TCCATACCAAGGTTAGCACGG	459	62,1
65 <i>Attrn16</i>	ATTGGGCGTAAAGCGTCTGTA	101522/ 137127	61,9
66 <i>Attrn16</i>	GTAACGACTTCGGGCATGG	102402/ 136247	61,5
75 <i>AtrhoB</i>	TATTATATGATAGCGGCAGGAAATT	24898	60,8
76 <i>AtrhoB</i>	ATAGGAGGATTCTTTCGCCACT	24068	60,5
55 <i>AtclpP</i> complete2	CCGACTAGGATAAAGGATGCTATTG	70690	61,4
56 <i>AtclpP</i> complete2	CCAAGAGGTTGATACCGAAATC	70908	59,8
422 5' <i>Atatp6-1</i>	GCGAGTCAATGCACTAACTTTTC	111840	60,3

423 3' <i>Atatp6-1</i>	CGCGAAAACAATAAGAAATTAGC	112662	59,3
424 5' <i>Atcox1</i>	TCCACAAACCACAAGGATATAGG	351386	60,1
425 3' <i>Atcox1</i>	AACATATGATGAGCCCAAACAAG	350530	60,2
217 5' <i>AtRpoTmp</i>	GGGCTAAGGTTGGAAGTCGT	Zk Chr. V	60,5
218 3' <i>AtRpoTmp</i>	GCCAAGATGATTTAAGTGTGGG	Zk Chr. V	60,7
215 5' <i>AtRpoTp</i>	GGCATTGGATACACTTGGAATAC	Zk Chr. II	62,7
216 3' <i>AtRpoTp</i>	CGGTTGGGTTTGACTCAGGAT	Zk Chr. II	63,4
25 5' <i>At18S</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	Zk Chr. II/ IV	57,3
26 3' <i>At18S</i>	ACTCGAAAGAGCCCGGTATT	Zk Chr. II/ IV	57,3

II.2.13 Nachweis von Reportergenen

II.2.13.1 Histochemischer *GUS*-Nachweis

Die histochemische Analyse der *GUS*-Expression wurde mit transgenen *GUS*::Pflanzen durchgeführt. Das Blattgewebe oder ganze Keimlinge unterschiedlichen Lichtregimen und Umwelteinflüssen ausgesetzter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden in einem Reaktionsgefäß mit frischer Färbelösung (Jefferson et al., 1987) bedeckt und im *Nucelite Vakuum Exsikator* (Nalgene) für 2 min vakuuminfiltriert. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 37°C. Die Dehydrierung und Entfernung von Chlorophyll und Karotinoiden wurde durch 20-minütige Waschschrte in einer aufsteigenden Ethanolreihe erreicht. Die Visualisierung erfolgte wahlweise mit dem Binokular Stemi SV6 oder dem Mikroskop Axioskop (beides Zeiss) und unter Verwendung der Digitalkamera *ProgRes C12* (Jenoptik) sowie der entsprechenden Software.

Färbelsg. 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0; 10 mM EDTA; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 2 mM Kaliumferrozyanid; 2 mM Kaliumferrizyanid; 100 mg/ml Chloramphenicol; 1 mg/ml X-Gluc (Fermentas)

II.2.14 Durchflusszytometrie der chromosomalen Ploidie

Für die Durchflusszytometrie wurden drei unabhängige Blattproben und Präparationen verwendet. Die Sortierung der Zellkerne (Barow und Meister, 2003) erfolgte entsprechend ihrer Ploidie in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Fuchs (IPK, Gatersleben). Die C-Werte wurden für ca. 10.000 Zellkerne pro Blattprobe gemessen. Die mittleren C-Werte, welche die Gesamtmenge der DNA in einem haploiden Genom angeben, wurden unter der Verwendung der Berechnung $[(2 \times n_{2C}) + (4 \times n_{4C}) + (8 \times n_{8C}) \dots] / [n_{2C} + n_{4C} + n_{8C} \dots]$ bestimmt.

III Ergebnisse

III.1 Plastidäre Transkription in Arabidopsis

III.1.1 Herstellung PEP-defizienter Arabidopsis-Pflanzen

An der Transkription der Plastome höherer Pflanzen ist neben der plastidenkodierten plastidären RNA-Polymerase PEP (Liere undBörner, 2007; Shiina et al., 2005) eine zweite plastidenlokalisierte, aber kernkodierte Transkriptionsaktivität NEP beteiligt, welche allerdings in grünen Pflanzengeweben nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Hess undBörner, 1999; Liere undBörner, 2007). Bisher konnten weder Mutanten noch transplastomische Pflanzen ohne PEP-Aktivität in Arabidopsis isoliert werden, die es ermöglichen würden, die Promotornutzung durch die verschiedenen Polymerasen zu unterscheiden. Um trotzdem zwischen NEP- und PEP-Promotoren zu unterscheiden und somit Hinweise auf die Rolle der NEP in der plastidären Transkription erhalten zu können, wurden chlorophylldefiziente Wildtyppflanzen von Arabidopsis ohne PEP-Aktivität generiert (Zubko undDay, 1998). Um die Biosynthese der PEP zu hemmen, wurden die Samen auf SEA-Medium mit dem Antibiotikum Spectinomycin, einem Inhibitor der prokaryotischen Translation, ausgebracht (vergl. Kap. I.1.5; Svab et al., 1990).

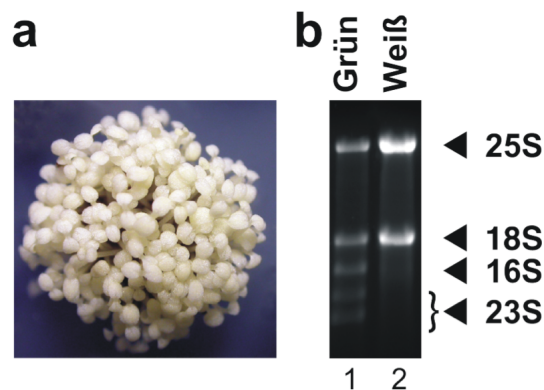


Abb. 7: Chlorophylldefiziente *Arabidopsis thaliana*. Samen von Arabidopsis keimen auf SEA-Medium mit dem Antibiotikum Spectinomycin und bilden chlorophylldefiziente Pflanzen (a). Aus 21 Tage alten Pflanzen isolierte RNA zeigt im Vergleich zu RNA aus grünem Blattgewebe (b, Spur 1) drastisch reduzierte Mengen plastidärer ribosomaler RNA (Spur 2). Positionen ribosomaler RNA sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Keimlinge bildeten weiße Kotyledonen und arretierten nach zehn Tagen Wachstum (Abb. 7a). Die aus 21 Tage alten weißen Kotyledonen isolierte RNA zeigte im Vergleich zur RNA aus grünem Blattgewebe (Abb. 7b, Spur 1) drastisch reduzierte Mengen plastidärer

ribosomaler RNAs (Abb. 7b, Spur 2), was auf den Verlust der Fähigkeit zur Translation in den Plastiden hindeutet.

III.1.2 Analyse plastidärer Promotoren in *Arabidopsis thaliana*

III.1.2.1 Identifizierung plastidärer Promotoren mittels 5'-RACE

Obwohl *Arabidopsis thaliana* in der modernen Pflanzenbiologie weitgehend als Modelorganismus etabliert ist, war bisher nur wenig über plastidäre Promotoren dieser Pflanze bekannt. Um die Promotornutzung ausgewählter plastidärer Gene zu untersuchen, wurde die Methode der 5'-RACE verwendet (Bensing et al., 1996; Kühn et al., 2005; Miyagi et al., 1998). Die Fähigkeit, im Gegensatz zu primären-, an sekundär-entstandenen RNA-5'-Enden einen RNA-Linker ligieren zu können, macht in einer anschließenden PCR-Reaktion mit Gen- und Linker-spezifischen Primern eine Identifizierung von primären Transkripten möglich (Kap. II.2.10).

Zur Unterscheidung zwischen Transkripten, die durch die PEP oder die NEP generiert werden, wurden Transkriptionsstartpunkte in RNAs aus grünem (+T^G) und chlorophylldefizientem weißem Blattgewebe (+T^W) identifiziert (verg. Kap. III.1.1). Als Kontrolle diente hierfür zunächst die Kartierung bereits bekannter PEP- und NEP-Promotoren. Für das Transkript von *psaA* wurde ein 305 bp langes PCR-Fragment isoliert, das nur in der TAP-behandelten RNA aus grünem Blattgewebe (+T^G) nachweisbar war. Da dieses Fragment weder in der RNA aus weißem Gewebe (+T^W), noch in der unbehandelten RNA (-T, Abb. 8a) detektierbar war, kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei diesem 5'-Ende um ein primäres Transkript handelt. Wie für *psaA* beschrieben (Fey et al., 2005), zeigte die Sequenzanalyse das native 5'-Ende von *psaA* an der Position -188 im Abstand zum Translationsstartpunkt.

Entsprechend früheren Veröffentlichungen konnten auch die Transkriptionsstartpunkte von *psaJ* (Nagashima et al., 2004), *psbA* (Liere et al., 1995; Shen et al., 2001), *clpP* (Sriraman et al., 1998) und *rrn16* (Sriraman et al., 1998) bestätigt werden. Im grünen Blattgewebe wurde das primäre RNA-5'-Ende des am PEP-Promotor *PpsaJ*-37 initiierten Transkripts detektiert (Daten nicht gezeigt). Im 5'-Bereich von *psbA* wurde in der +T^G-Probe das native Ende an der Position -77 lokalisiert (Abb. 8b, +T^G). Interessanterweise wurde auch in der +T^W-Probe ein schwaches PCR-Signal detektiert (+T^W). Die Sequenzanalyse dieses Fragmentes zeigte die gleiche Initiationsstelle *PpsbA*-77 wie in der

+T^G-Probe. Aus dieser Beobachtung wird deutlich, dass in den spectinomycinbehandelten Pflanzen einige PEP-Transkripte noch immer in geringen Mengen vorliegen und durch eine sensitive PCR-Methode detektiert werden können.

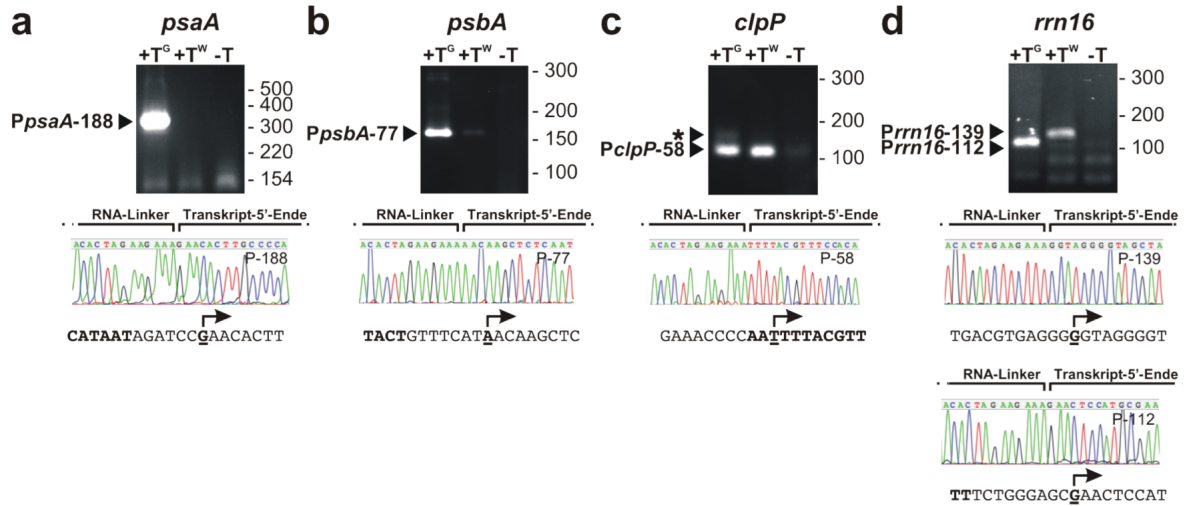


Abb. 8: 5'-RACE Analyse plastidärer Transkripte von *psaA*, *psbA*, *clpP* und *rrn16*. Genspezifische 5'-RACE-Produkte für *psaA* (a), *psbA* (b), *clpP* (c) und *rrn16* (d) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe von Arabidopsis wurden längsseits eines Molekulargewichtsmarkers im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (oben). Die Größen sind in bp angegeben. Im Kontrollversuch wurden die RNAs nicht mit der TAP (-T) behandelt. Primären Transkripten entsprechende Produkte sind durch Pfeile und Namen der entsprechenden Promotoren gekennzeichnet (vergl. Tab. 9). Chromatogramme zeigen Sequenzen an der Ligationstelle der 5'-RACE-Produkte. RNA-Linker und Transkript-5'-Enden sind markiert. Sequenzen der Promotorregionen beinhalten putative Promotormotive (fett markiert). Transkriptionsstartpunkte sind unterstrichen (unten).

Das primäre 5'-Ende des starken Typ-II *PclpP*-58 NEP-Promotors konnte sowohl im grünen, als auch im weißen Blattgewebe detektiert werden (Abb. 8c). Zusätzlich wurde ein weiteres PCR-Produkt isoliert, das einem vom PEP-Promotor *PclpP*-115 initiierten Transkript entsprechen könnte (Abb. 8c, +T^G, Stern). Eine Klonierung und Sequenzierung dieses PCR-Fragments war jedoch nicht erfolgreich. Dagegen konnten in der +T^G-Probe das am PEP-Promotor *Prrn16*-112 und in der +T^W-Probe das am Pc-Promotor *Prrn16*-139 initiierte primäre Transkript charakterisiert werden (Abb. 8d). Die Kartierung dieser fünf bereits bekannten Promotoren zeigte, dass es mit der 5'-RACE aus grünem und chlorophylldefizienten Blattgewebe möglich ist, PEP- und NEP-Promotoren zu unterscheiden.

In Tabak wird *atpB*, das Gen für die β -Untereinheit des CF₁ ATPase-Komplexes, von mindestens vier Promotoren transkribiert (Hajdukiewicz et al., 1997). In der 5'-RACE

Analyse der *atpB*-Transkripte aus *Arabidopsis* konnten zwei Initiationsstartpunkte detektiert werden (Abb. 9a). Das starke, dem ersten Transkript entsprechende PCR-Signal konnte besonders im grünen Blattgewebe detektiert und als eine Gruppe an den Positionen -520, -517 und -515 charakterisiert werden (*atpB*-a, +T^G). Stromaufwärts konnten eukaryotische -35/-10 Promotorkonsensusmotive eines PEP-Promotors lokalisiert werden (Abb. 40a). Ähnlich wie für *psbA* konnten auch hier geringe Mengen an Transkripten der PEP im weißen Blattgewebe beobachtet werden (*atpB*-a, +T^W). Unter Verwendung eines weiteren Oligonukleotids wurde sowohl im grünen, als auch im weißen Blattgewebe das zweite primäre 5'-Ende von *atpB* an der Position -318 identifiziert (Abb. 9a, *atpB*-b). Dieser Transkriptionsstartpunkt trägt stromaufwärts die Sequenz CATA mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Motiv von Typ-Ia NEP-Promotoren (Abb. 40b).

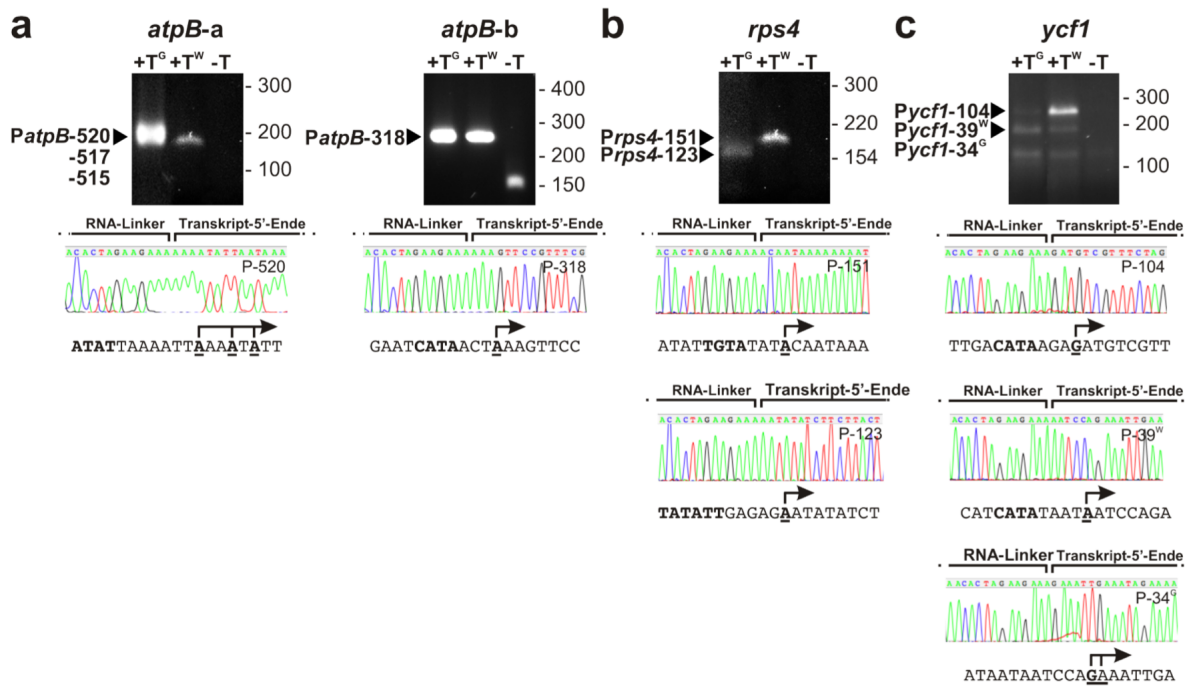


Abb. 9: Gene *atpB*, *rps4* und *ycf1* aus *Arabidopsis* werden sowohl von NEP, als auch von PEP-Promotoren transkribiert. Genspezifische 5'-RACE-Produkte für *atpB* (a), *rps4* (b) und *ycf1* (c) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe wurden längsseits eines Molekulargewichtsmarkers im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (oben). Die Größen sind in bp angegeben. Im Kontrollversuch wurden die RNAs nicht mit der TAP (-T) behandelt. Primären Transkripten entsprechende Produkte sind durch Pfeile und Namen der entsprechenden Promotoren gekennzeichnet (vergl. Tab. 9). Chromatogramme zeigen Sequenzen an der Ligationsstelle der 5'-RACE-Produkte. RNA-Linker und Transkript-5'-Enden sind markiert. Sequenzen der Promotorregionen beinhalten putative Promotormotive (fett markiert). Transkriptionsstartpunkte sind unterstrichen (unten).

Stromaufwärts lokalisierte NEP- (Abb. 40b) und PEP-Promotorelemente (Abb. 40a) wurden auch für primäre Transkripte von *rps4* identifiziert (Abb. 9b). Während das von der PEP an der Position -123 initiierte Transkript nur in der +T^G-Probe detektiert werden konnte, wurde das native 5'-Ende von *Prps4*-151 nur im weißen Blattgewebe (+T^W) gefunden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass *rps4* im grünen Gewebe von der PEP, aber nicht von der NEP transkribiert wird.

In der Analyse der *ycf1*-Transkripte wurden drei Transkriptionsstartpunkte an den Positionen -104, -39 und -34 (Abb. 9c) detektiert. Der Promotor *Pycf1*-104 konnte sowohl im grünen, als auch im weißen Blattgewebe charakterisiert werden (+T^G und +T^W, 255 bp). Die Sequenzanalyse des zweiten, kleineren PCR-Fragmentes zeigte zwei unterschiedliche 5'-Enden (190 bp in +T^W und 185 bp in +T^G). Das aus dem weißen Blattgewebe isolierte Fragment der Größe von 190 bp entsprach einem Transkriptionsstartpunkt an der Position -39 (in der Abb. 9c bezeichnet mit *Pycf1*-39^W). Das im grünen Gewebe detektierte 185 bp große PCR-Fragment platzierte den Transkriptionsstartpunkt an der Position -34 (in der Abb. 9c bezeichnet mit *Pycf1*-34^G). Stromaufwärts von *Pycf1*-104 und *Pycf1*-39 wurde das Motiv CATA von Typ-I NEP-Promotoren (Abb. 40b) identifiziert. Die Promotorsequenz von *Pycf1*-39 ist hoch konserviert zum einzigen Promotor von *ycf1* in Tabak *NtaPycf1*-41 (Hajdukiewicz et al., 1997) und wurde als Teil der Gruppe der Typ-Ib NEP-Promotoren klassifiziert (Abb. 40b). *Pycf1*-34 ist im grünen Gewebe aktiv und weist stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt typische -35/-10 Promotorkonsensusmotive von PEP-Promotoren auf. Diese Ergebnisse weisen auf einen Wechsel zwischen der NEP und der PEP in unterschiedlichem Gewebe im 5'-Bereich von *ycf1* hin.

In der 5'-RACE Analyse der *accD*-Transkripte (Abb. 10a) wurden aus TAP-behandelter Arabidopsis-RNA des weißen Blattgewebes (+T^W) zwei PCR-Fragmente der Größen 170 bp und 240 bp amplifiziert. Da diese Produkte auch in der TAP-unbehandelten zellulären RNA (-T) lokalisiert wurden, entsprechen sie prozessierten 5'-Enden der RNA. Die Sequenzanalyse zweier weiterer Banden (174 bp und 94 bp) aus der +T^W-Probe ergab native 5'-Enden von *accD* an den Positionen -252 und -172. Diese konnten weder im grünen Gewebe (+T^G), noch in der -TAP-Kontrolle identifiziert werden (-T). Für *PaccD*-252 wurde das Sequenzmotiv CATA und für *PaccD*-172 das Motiv TAAA mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Konsensusmotiv von Typ-I NEP-Promotoren direkt stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte lokalisiert. Während *PaccD*-252 in die Gruppe der Typ-Ia NEP-Promotoren klassifiziert wurde (Abb. 40b), erlaubte das stromaufwärts von *PaccD*-172 lokalisierte Motiv ATAAGAA eine Zuordnung diesen Promotors in die Gruppe der Typ-Ib

NEP-Promotoren. Die Prozessierungsstelle, welche das 240 bp große PCR-Fragment ergibt, deutet auf eine Initiation der Transkription weiter stromaufwärts hin. Weitere Analysen der intergenischen Region von *rbcL-accD* ergaben keine zusätzlichen 5'-Enden der primären Transkripte, weder stromaufwärts von *accD* noch in oder stromaufwärts von *rbcL*.

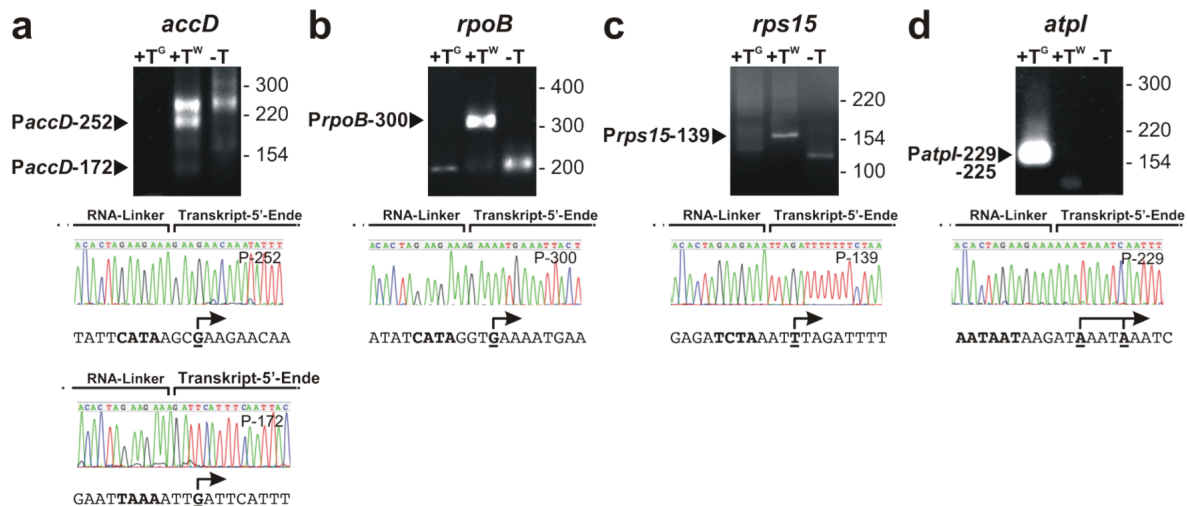


Abb. 10: Gene *accD*, *rpoB*, *rps15* und *atpI* werden in *Arabidopsis* entweder von NEP oder von PEP-Promotoren transkribiert. Genspezifische 5'-RACE-Produkte für *accD* (a), *rpoB* (b), *rps15* (c) und *atpI* (d) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe wurden längsseits eines Molekulargewichtsmarkers im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (oben). Die Größen sind in bp angegeben. Im Kontrollversuch wurden die RNAs nicht mit der TAP (-T) behandelt. Primären Transkripten entsprechende Produkte sind durch Pfeile und Namen der entsprechenden Promotoren gekennzeichnet (vergl. Tab. 9). Chromatogramme zeigen Sequenzen an der Ligationsstelle der 5'-RACE-Produkte. RNA-Linker und Transkript-5'-Enden sind markiert. Sequenzen der Promotorregionen beinhalten putative Promotormotive (fett markiert). Transkriptionsstartpunkte sind unterstrichen (unten).

In der 5'-RACE Analyse vom *rpoB*-Operon, das drei Untereinheiten der plastidären RNA-Polymerase PEP kodiert, wurde ein intensives PCR-Produkt der Größe 328 bp in der +T^W-Probe gefunden (Abb. 10b). Die Sequenzanalyse ergab ein natives 5'-Ende von *rpoB* an der Position -300. Im Unterschied zum Typ-Ia NEP-Promotor von *rpoB* in Tabak NtaPrpoB-345 (Liere und Maliga, 1999), lassen die direkt stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt gefundenen Sequenzmotive CATA und AGCGAA eine Zuordnung von PrpoB-300 als Typ-Ib NEP-Promotor zu (Abb. 40b).

Die Charakterisierung des *rps15*-Transkriptes ergab nur im weißen Blattgewebe aus *Arabidopsis* ein primäres 5'-Ende der RNA 139 bp stromaufwärts vom Translationsstartpunkt (Abb. 10c, +T^W). Der Promotor Prps15-139 konnte im grünen Gewebe (+T^G) nicht detektiert werden. Das Sequenzmotiv TCTA und das weiter

stromaufwärts lokalisierte Motiv ACAGAA gestatteten eine Zuordnung dieses Promotors in die Gruppe der Typ-Ib NEP-Promotoren (Abb. 40b).

In Tabak wird die Transkription von *atpI* im unterschiedlichen Gewebe an zwei verschiedenen Startpunkten initiiert (Hajdukiewicz et al., 1997; Miyagi et al., 1998). In der 5'-RACE Analyse der *atpI*-Transkripte aus Arabidopsis hingegen konnte nur ein einziger Promotor identifiziert werden (Abb. 10d). Das starke, dem primären Transkript entsprechende PCR-Signal wurde nur im grünen Blattgewebe detektiert und als eine Gruppe an den Positionen -229 und -225 charakterisiert (Abb. 10d, +T^G). Direkt stromaufwärts wurden -35/-10 Konsensusmotive eines PEP-Promotors lokalisiert. Aus diesem Grund wurde der Promotor *PatpI*-229 der Gruppe der PEP-Promotoren zugeordnet (Abb. 40a).

Die Gene *rpl33* und *rps18* kodieren Proteine des plastidären Genexpressionssystems und bilden zusammen ein kleines Gencluster (Sato et al., 1999; Weglöhner und Subramanian, 1991). Trotz des Einsatzes unterschiedlicher Primer in der 5'-RACE Analyse konnten stromaufwärts von *rpl33* keine RNA-5'-Enden identifiziert werden. Dafür wurden unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide für den intergenischen Bereich von *rpl33-rps18* aus TAP-behandelter RNA aus grünem Blattgewebe (Abb. 11a, +T^G) zwei PCR-Fragmente der Größen 290 bp und 220 bp amplifiziert. Da diese Produkte auch in der TAP-unbehandelten zellulären RNA (-T) lokalisiert wurden, entsprechen sie prozessierten 5'-Enden der RNA. Sowohl im grünen (+T^G), als auch im weißen Blattgewebe (+T^W) wurde ein weiteres schwaches PCR-Fragment der Größe von 140 bp detektiert. Die Sequenzanalyse platzierte das 5'-Ende 148 bp stromaufwärts von *rps18*. Obwohl das 5'-Ende (unterstrichen) Teil des Motivs CATATATATAA mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Konsensusmotiv von Typ-I NEP-Promotoren war, resultiert es aus der Prozessierung und nicht aus der Transkription, da es auch in der TAP-unbehandelten RNA detektierbar war (Abb. 11a, -T).

Ähnlich wie *rps18*, liegt auch das Gen *rps8* innerhalb eines Genclusters. Zusammen mit neun weiteren Genen für Proteine der kleinen und großen Untereinheit der plastidären Ribosomen und dem Gen *rpoA*, welches die α -Untereinheit der PEP kodiert, bildet es das *rpl23*-Operon (Sato et al., 1999). In der 5'-RACE Analyse der *rps8*-Transkripte aus Arabidopsis konnte zunächst ein einziger Promotor identifiziert werden (Abb. 11b). Die Sequenzanalyse des starken, aus dem weißen Blattgewebe amplifizierten 259 bp großen PCR-Produktes, platzierte das native 5'-Ende der RNA an der Position -208 (*rps8*-a, +T^W). Der Transkriptionsstartpunkt ist innerhalb des Motivs AATATCGATAG lokalisiert. Da

dieses 5'-Ende nicht im grünen Blattgewebe detektiert werden konnte, wurden für die Analyse zwei weitere Gewebearten eingesetzt, das Blühmeristem vollständig entwickelter Blüten adulter Pflanzen und das Gesamtgewebe aus vier Tage alten Kotyledonen. Damit war es möglich, die Transkripte unterschiedlicher Entwicklungsstadien von Arabidopsis miteinander zu vergleichen.

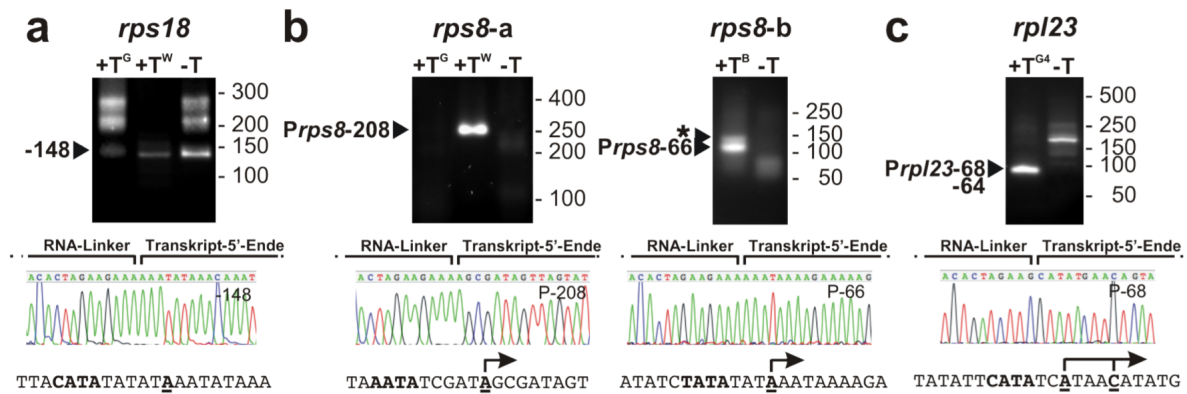


Abb. 11: Charakterisierung der plastidären Transkripte von *rps18*, *rps8* und *rpl23*. Genspezifische 5'-RACE-Produkte für *rps18* (a) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe und für *rps8* (b) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe und Blühmeristem (+T^B) sowie für *rpl23* (c) aus grünen vier Tage alten Kotyledonen (+T^{G4}) wurden längsseits eines Molekulargewichtsmarkers im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (oben). Die Größen sind in bp angegeben. Im Kontrollversuch wurden die RNAs nicht mit der TAP (-T) behandelt. Primären Transkripten entsprechende Produkte sind durch Pfeile und Namen der entsprechenden Promotoren gekennzeichnet (vergl. Tab. 9). Das sekundäre Transkript ist durch einen Pfeil und seine Position markiert. Chromatogramme zeigen Sequenzen an der Ligationsstelle der 5'-RACE-Produkte. RNA-Linker und Transkript-5'-Enden sind markiert. Sequenzen der Promotorregionen beinhalten putative Promotormotive (fett markiert). 5'-Enden sind unterstrichen (unten).

Aus TAP-behandelter RNA des Blühmeristems und der Keimlinge konnten nativen 5'-Enden entsprechende PCR-Fragmente amplifiziert werden. Somit wurde im Blühmeristem ein weiteres primäres 5'-Ende von *rps8* lokalisiert (Abb. 11b, *rps8*-b, +T^B, 116bp). Der Transkriptionsstartpunkt liegt 66 bp stromaufwärts von ATG innerhalb des Motivs TATATATAAA. Die Sequenz eines weiteren PCR-Signals aus dem Blühmeristem (Abb. 11b, +T^B, Stern) konnte nicht detektiert werden. Sowohl *Prps8*-208, als auch *Prps8*-66 liegen im intergenischen Bereich zwischen *rps8* und dem davor lokalisierten Gen *rpl14*. Beide Promotoren konnten im Gewebe der Kotyledonen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Hier gelang jedoch unter Verwendung eines weiteren Oligonukleotids die Isolation eines weiteren PCR-Produkts der Größe 93 bp. Dieses entspricht einem nativen 5'-Ende stromaufwärts vom *rpl23*-Operon an den Positionen -68 und -64. Für *Prps8*-208 wurde das Sequenzmotiv AATA, für *Prps8*-66 das Motiv TATA und für *Prpl23*-68 das

Motiv CATA mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Konsensusmotiv von Typ-I NEP-Promotoren direkt stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte lokalisiert. Während *Prps8*-208 und *Prps8*-66 der Gruppe der Typ-Ia NEP-Promotoren zugeordnet wurden, gestattete das stromaufwärts von *Prpl23*-68 gefundene Motiv AACGAA eine Einordnung dieses Promotors in die Gruppe der Typ-Ib NEP-Promotoren (Abb. 40b). Die Promotorsequenz von *Prpl23*-68 ist hoch konserviert zum einzigen Promotor von *rpl23* in Gerste (HvPrpl23-73; Hübschmann und Börner, 1998).

ycf2 gehört zu den nicht vollständig charakterisierten offenen Leserastern in Plastiden höherer Pflanzen. Die Funktion des Genproduktes von *ycf2* konnte bisher nicht hinreichend aufgeklärt werden. Die Herstellung homoplastomischer Mutanten in Tabak mit Deletion oder Insertion innerhalb von *ycf2* war bisher nicht möglich (Drescher et al., 2000). In der 5'-RACE Analyse von *ycf2* wurden aus weißem Blattgewebe drei PCR-Fragmente detektiert (Abb. 12a, *ycf2*-a, +T^W). Keines der drei PCR-Produkte konnte im grünen Blattgewebe beobachtet werden (*ycf2*-a, +T^G). Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Untersuchungen in Tabak, bei denen der NEP-Promotor *Pycf2*-1577 in Blättern der *ΔrpoB* Mutante, aber nicht in denen des Wildtyps aktiv war (Hajdukiewicz et al., 1997). In der Sequenzanalyse des 71 bp langen Produkts wurde das RNA-5'-Ende als eine Gruppe an den Positionen -1506 und -1504 innerhalb des Motivs AATAACTTATIG mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Konsensusmotiv platziert. Der Promotor *Pycf2*-1506 wurde aufgrund des stromaufwärts lokalisierten Motivs ATAGGAA in die Gruppe der Typ-Ib NEP-Promotoren klassifiziert (Abb. 40b). Die Detektion der Sequenz des 80 bp langen Produkts war nicht erfolgreich (*ycf2*-a, +T^W, Stern). Da dieses Produkt auch in der TAP-unbehandelten RNA (*ycf2*-a, -T) lokalisiert wurde, entspricht es höchstwahrscheinlich einem prozessierten 5'-Ende der RNA. Das 194 bp große Produkt konnte einem nativen 5'-Ende der RNA an den Positionen -1629 und -1627 zugeordnet werden. Unter Verwendung eines weiteren Oligonukleotids wurde ein starkes PCR-Produkt der Größe 499 bp in den Proben +T^B und +T^W amplifiziert (*ycf2*-b). Die Sequenzanalyse ergab das native 5'-Ende von *ycf2* an der Position -1040. Die Detektion der Sequenz des 550 bp langen Produkts war nicht möglich (*ycf2*-b, +T^W, Stern). Das Sequenzmotiv CATA des Promotors *Pycf2*-1629 und das Motiv CGTA des Promotors *Pycf2*-1040 erlaubten eine Zuordnung beider Transkriptionsstartpunkte zur Gruppe der Typ-Ia NEP-Promotoren (Abb. 40b).

Für das Gen *ycf6*, welches eine Untereinheit des Cytochrom *b₆f*-Komplexes kodiert (Hager et al., 1999), konnte das primäre Transkriptende eines PEP-Promotors an der Position -53 detektiert werden (*Pycf6*-53; Daten nicht gezeigt).

Die Verwendung des Blühmeristems neben grünen und weißen Blattgeweben gestattete die Identifizierung weiterer Promotoren. Da die Gene *rpoB* und *ycf1* für diese Arbeit von großem Interesse waren, wurden ihre bereits im grünen und weißen Blattgewebe charakterisierten Transkriptionsstartpunkte auch im Blühmeristem untersucht. Die im weißen Blattgewebe beschriebenen *ycf1*-Promotoren *Pycf1*-104 und *Pycf1*-39 (Abb. 9c) wurden auch im Blühmeristem lokalisiert (Abb. 12b). Obwohl das Blühmeristem neben nicht-grünem Gewebe der Frucht, Staub- und Blütenblätter auch grünes Gewebe der Kelchblätter beinhaltet, konnte hier der im grünen Blattgewebe detektierte Promotor *Pycf1*-34 (Abb. 9c) nicht identifiziert werden.

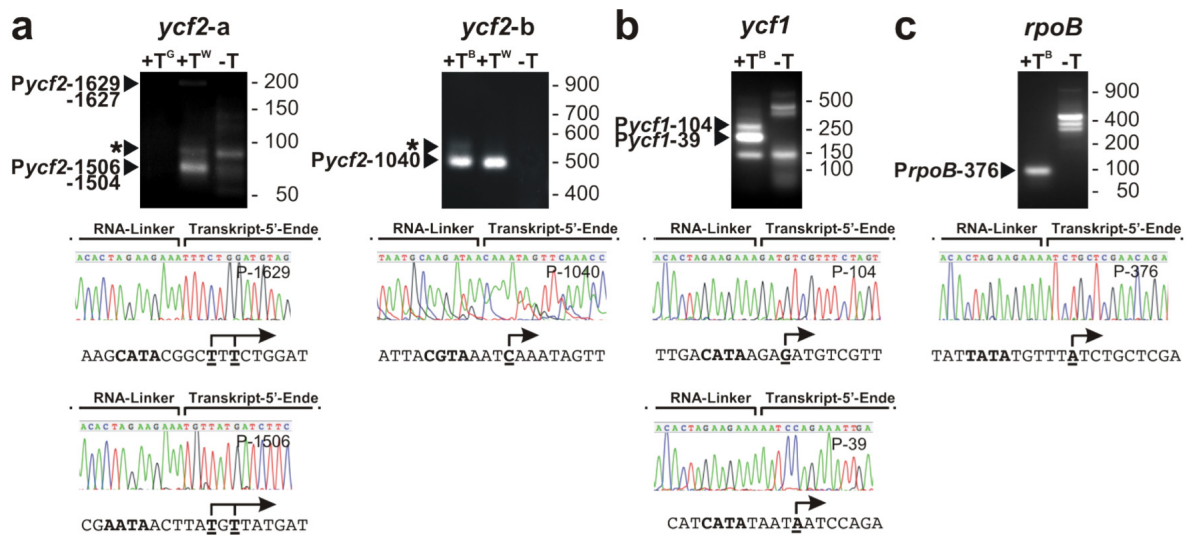


Abb. 12: Charakterisierung der plastidären Transkripte von *ycf2*, *ycf1* und *rpoB* im Blühmeristem. Genspezifische 5'-RACE-Produkte für *ycf2* (a) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe und Blühmeristem (+T^B) sowie für *ycf1* (b) und *rpoB* (c) aus Blühmeristem (+T^B) wurden längsseits eines Molekulargewichtsmarkers im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (oben). Die Größen sind in bp angegeben. Im Kontrollversuch wurden die RNAs nicht mit der TAP (-T) behandelt. Primären Transkripten entsprechende Produkte sind durch Pfeile und Namen der entsprechenden Promotoren gekennzeichnet (vergl. Tab. 9). Chromatogramme zeigen Sequenzen an der Ligationsstelle der 5'-RACE-Produkte. RNA-Linker und Transkript-5'-Enden sind markiert. Sequenzen der Promotorregionen beinhalten putative Promotormotive (fett markiert). Transkriptionsstartpunkte sind unterstrichen (unten).

Der im weißen Blattgewebe charakterisierte *PrpoB*-300 Promotor (Abb. 10b) konnte auch im Blühmeristem identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte zusätzlich konnte aus TAP-behandelter RNA des Blühmeristems ein 87 bp großes PCR-

Produkt amplifiziert werden (Abb. 12c, +T^B). Das native 5'-Ende der RNA liegt an der Position -376 als Teil des Motivs TATATGTTTAT und konnte daher der Gruppe der Typ-Ia NEP-Promotoren zugeordnet werden (Abb. 40b). Möglicherweise handelt es sich hier um eine gewebsspezifische Kontrolle der Expression des *rpoB* Gens durch die beiden NEP-Promotoren.

Für das Gen *psbI*, welches ein Protein des PS II kodiert (Meng et al., 1991), konnte im Blühmeristem das native Transkriptende eines PEP-Promotors an der Position -44 lokalisiert werden (*PpsbI*-44; Daten nicht gezeigt).

Tab. 9: Mittels 5'-RACE Analyse detektierte Transkriptionsstartpunkte.^b

Gen	Promotor	Sequenz	Anzahl der Klone			
			+T ^G	+T ^W	+T ^B	+T
<i>psaJ</i>	<i>PpsaJ</i> -37	TATATAT TACT TATATAT <u>A</u> ATGTAATA	16/16	n.d.	/	/
<i>rps4</i>	<i>Prps4</i> -123	AATCTG TATATT GAGAG <u>A</u> ATATATCT	6/12	n.d.	/	/
<i>ycf6</i>	<i>Pycf6</i> -53	TTTCAC TATTATT AGTG <u>A</u> ACAATAAT	9/9	n.d.	/	19/28 ^S
<i>atpI</i>	<i>PatpI</i> -229 ^a	TTGATT AATAATA AGAT <u>A</u> AAT <u>A</u> AATC	36/53	n.d.	11/12	8/8 ^{G4}
<i>ycfI</i>	<i>PycfI</i> -34 ^a	CATC ATATAATA ATCCAG <u>A</u> AATTGAA	7/10	n.d.	n.d.	/
<i>psbI</i>	<i>PpsbI</i> -44	TTTGAT TATAAAAA ATAGAG <u>A</u> ATCTATT	n.d.	n.d.	11/15	/
<i>psaA</i>	<i>PpsaA</i> -188	TATGT CATAA TAGATCC <u>G</u> AACACTTG	91/106	n.d.	/	8/8 ^{G4}
<i>psbA</i>	<i>PpsbA</i> -77	ATGTT TACT GTTCAT <u>A</u> ACAAGCTC	72/73	32/32	10/12	7/8 ^{G4}
<i>atpB</i>	<i>PatpB</i> -520 ^a	TATTT TAATATT AAAAAT <u>T</u> AAAA <u>T</u> ATTA	27/36	18/20	1/1	/
<i>rrn16</i>	<i>Prrn16</i> -112	GCT TATATT TCTGGGAGC <u>G</u> AACCTCCAT	37/45	12/16	/	/
<i>rpl23</i>	<i>Prpl23</i> -68 ^a	TGTGGTATATT CATATC ATAA <u>C</u> ATAT	n.d.	n.d.	n.d.	6/8 ^{G4}
<i>accD</i>	<i>PaccD</i> -252	TTCTTATATT CATAAGC GAAGAACAA	n.d.	12/16	/	/
<i>atpB</i>	<i>PatpB</i> -318	AATAATGAAT CATAACT AAAGTTCCG	41/64	37/44	n.d.	/
<i>rpoB</i>	<i>PrpoB</i> -300	TATGTAATAT CATAGGT GAAAAATGAA	n.d.	66/99	18/21	10/12 ^{WR}
<i>ycfI</i>	<i>PycfI</i> -104	GTGTCATTGAC CATAAGAG ATGTCGTT	5/10	7/8	6/8	/
<i>rps8</i>	<i>Prps8</i> -66	CGTCTATATCT TATATAT AAATAAAAG	n.d.	n.d.	14/16	/
<i>rps4</i>	<i>Prps4</i> -151	TTATATATATT TGTATAT ACAATAAAA	n.d.	9/10	/	/
<i>ycf2</i>	<i>Pycf2</i> -1040	CTTCCAATTAC GTAAAT CAAATAGTT	n.d.	n.d.	12/16	/
<i>accD</i>	<i>PaccD</i> -172	CATTTAGAATT AAAAATT GATTCATTT	n.d.	10/16	/	/
<i>rps15</i>	<i>Prps15</i> -139	CTTTTGTAGAT CTAAAT TTAGATTTT	n.d.	11/16	/	/
<i>ycfI</i>	<i>PycfI</i> -39	CAAAATCAT CATATAAT AATCCAGAA	n.d.	17/19	12/12	/
<i>ycf2</i>	<i>Pycf2</i> -1629 ^a	CTTCCAAAG CATACGGCT TTCTGGAT	n.d.	27/56	6/8	/
<i>rpoB</i>	<i>PrpoB</i> -376	CTATTTAT TATATGTTT ATCTGCTCG	n.d.	n.d.	18/18	/
<i>rps8</i>	<i>Prps8</i> -208	AAGATCT AAATAT CGATAGCGATAGT	n.d.	8/8	/	/
<i>ycf2</i>	<i>Pycf2</i> -1506	ATCTGCCG AAATACTT ATGTTATGAT	n.d.	10/12	/	/
<i>clpP</i>	<i>PclpP</i> -58	AAAAAACGAAACCC AAATTTACGTT	38/41	17/18	/	/
<i>rrn16</i>	<i>Prrn16</i> -139	TGGGATTGACGTGAGGG <u>G</u> GTTAGGGGT	n.d.	33/38	/	/

^a Transkriptionsinitiation erfolgt an mehr als einem Nukleotid in einer Promotorregion. Die angegebene Häufigkeit ergibt sich aus der Summe der Häufigkeiten aller Transkriptionsstartpunkte an diesem Promotor. n.d., nicht detektiert; S, Samen; G4, grüne 4 Tage alte Keimlinge; WR, Wurzel.

^b Nukleotide, an denen die Initiation stattfindet, sind unterstrichen. Promotormotive sind fett markiert. Die Anzahl der sequenzierten Klone für jeden Promotor ist angegeben zusammen mit der Häufigkeit des Auftretens des jeweiligen Transkript-5'-Endes, wie es in der TAP-behandelten RNA aus dem grünen (+T^G) und weißen (+T^W) Blattgewebe sowie dem Blühmeristem (+T^B) und den weiteren Gewebearten (siehe Text) detektiert wurde.

Die charakterisierten Transkriptionsstartpunkte mit der sie umgebenden Sequenz sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. Angegeben ist für jeden Promotor die Häufigkeit des

Auftretens des jeweiligen Transkript-5'-Endes in TAP-behandelten Proben für grünes (+T^G, vierte Spalte) und weißes (+T^W, fünfte Spalte) Blattgewebe, sowie das Blühmeristem (+T^B, sechste Spalte) im Gesamtpool der sequenzierten Klone. In der letzten Spalte (+T) der Tabelle 9 ist die in den jeweils verschiedenen Gewebearten detektierte Anzahl der Klone angegeben - noch nicht gekeimte Samen (^S), grüne vier Tage alte Keimlinge (^{G4}) sowie Wurzel (^{WR}).

III.1.2.2 Analyse der plastidären Promotoren mittels *Primer Extension Assays*

Mittels 5'-*RACE* Analyse wurden Transkriptionsstartpunkte einer Reihe von plastidären Genen charakterisiert (Kap. III.1.2). Für die Untersuchung der Regulation der Transkription des Plastoms durch Licht (Kap. III.2.2) sowie die Charakterisierung der spezifischen Rollen von RpoTp und RpoTmp unter Verwendung von Mutanten (Kap. III.2.3) wurde parallel eine Auswahl plastidärer Gene getroffen, deren Transkription mittels *Primer Extension Assays* zunächst im Wildtyp analysiert werden sollte. Hierzu gehören sowohl Gene, die entweder von einem PEP- (*psbA*) oder einem NEP-Promotor (*rpoB*) transkribiert werden, als auch Gene, die von multiplen PEP- und NEP-Promotoren unterschiedlichen Typs (*atpB*, *ycf1*, *rrn16* und *clpP*) abgelesen werden (vergl. Kap. III.1.2.1). Die *Primer Extension* Analyse wurde mit 5 µg (*psbA*), 10 µg (*clpP*), 15 µg (*atpB*, *rrn16*, *ycf1*) und 20 µg (*rpoB*) Gesamt-RNA aus grünem Wildtypgewebe und weißem Blattgewebe chlorophylldefizienter Pflanzen (vergl. Kap. III.1.1), sowie wahlweise aus Blühmeristem von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt.

Die in der 5'-*RACE* Analyse charakterisierten Promotoren konnten in der *Primer Extension* Analyse bestätigt werden. Wie erwartet, wurden alle untersuchten PEP-Promotoren im grünen Blattgewebe (*PatpB*-520; *Pycf1*-34; *Prrn16*-112, *PclpP*-115; *PpsbA*-77; Abb. 13, G, Spuren 1) detektiert. Doch während die starken PEP-Promotoren *Prrn16*-112 (Abb. 13b) und *PpsbA*-77 (Abb. 13c) in geringem Maße auch im weißen Blattgewebe (W, Spuren 3) beobachtet werden konnten, waren die primären Transkripte von *PatpB*-520 und *Pycf1*-34 (Abb. 13a) nicht im weißen Gewebe sichtbar. Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu der schwache PEP-Promotor *PclpP*-115 (Abb. 13c) im weißen Blattgewebe (W, Spur 3) in gleicher Stärke wie im grünen Gewebe (G, Spur 1) detektiert werden. Möglicherweise könnte es sich bei dem Promotor *PclpP*-115 um einen anderen Promotortyp handeln, als bisher angenommen (Sriraman et al., 1998). Im weißen Gewebe (W, Spuren 3) wurden die Typ-Ia (*PatpB*-318 und *Pycf1*-104, Abb. 13a) und Typ-Ib NEP-

Promotoren (*PycfI*-39, Abb. 13a; *PrpoB*-300, Abb. 13b) detektiert. Der Pc-Promotor *PrrnI*6-139 (Abb. 13b) sowie der starke Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 (Abb. 13c) wurden in beiden Gewebeproben beobachtet. Da das Blühmeristem aus grünem und weißem Gewebe besteht, wurden hier sowohl PEP-, als auch NEP-Promotoren identifiziert (B, Spuren 2).

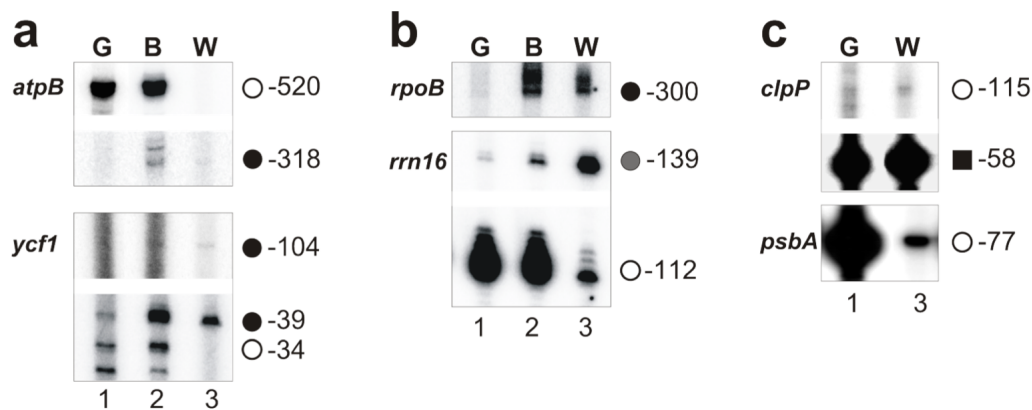


Abb. 13: Charakterisierung der Promotoren von *atpB* und *ycf1* (a), *rrn16* und *rpoB* (b) sowie *clpP* und *psbA* (c) von *Arabidopsis thaliana*. RNA aus grünem (G, Spuren 1) und weißem spectinomycinbehandeltem (W, Spuren 3) Blattgewebe sowie Blühmeristem (B, Spuren 2) wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. Detektierte Typ-I NEP- (●), Typ-II NEP- (■), Pc- (●) und PEP- (○) Promotoren sind durch den Abstand in Nukleotiden zwischen den Transkriptionsstartpunkten und dem Startcodon der Translation beschrieben.

Die Verwendung vom chlorophylldefizienten Gewebe von *Arabidopsis* mit fehlender PEP-Aktivität hat eine Unterscheidung zwischen NEP- und PEP-Promotoren erlaubt. Der Einsatz der sensitiven 5'-*RACE* Analyse (Kap. III.1.2.1) hat die Charakterisierung von Transkriptionsinitiationsstellen ausgewählter plastidärer Gene ermöglicht. In *Primer Extension* Assays konnten zuvor kartierte Promotoren erfolgreich detektiert werden.

III.1.3 Analyse der Transkriptakkumulation im chlorophylldefizienten Gewebe

Die Daten der 5'-*RACE* Analyse (Kap. III.1.2.1) und der *Primer Extension* Assays (Kap. III.1.2.2) zeigten eine verstärkte Akkumulation einzelner NEP-generierter Transkripte im weißen Gewebe. Diese Beobachtung warf die Frage auf, wie hoch die allgemeinen Transkriptmengen in diesem Gewebe sind. Hierzu wurde zunächst die Transkriptakkumulation der kernkodierten organellenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen untersucht.

Ähnlich wie in früheren Studien reifer Blätter von *Chemopodium album* und *Arabidopsis thaliana* (Hedtke et al., 1997; Weihe et al., 1997) zeigte die Analyse der mRNA-Akkumulation mittels *Northern Blot* Analyse nur geringe *RpoT*-Transkriptmengen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die *RpoT*-Akkumulation mittels der sensitiveren Methode der quantitativen *real-time*-PCR untersucht (s. Kap. II.2.7.2). Für diese Analyse wurde RNA aus grünem und spectinomycinbehandeltem weißem Blattgewebe eingesetzt, wie sie für die Analyse der Transkriptionsstartpunkte mittels 5'-*RACE* Analyse verwendet wurde (Kap. III.1.2.1).

Die stationären Transkriptmengen der Gene *RpoTp* und *RpoTmp* waren in chlorophylldefizienten Pflanzen 2- bis 3-fach erhöht im Vergleich zum grünen Blattgewebe (Abb. 14). Diese Beobachtung korrelierte mit Untersuchungen der *GUS*-Expression unter der Kontrolle der *RpoTp*- und *RpoTmp*-Promotoren im spectinomycinbehandelten Gewebe (Abb. 27). Interessanterweise zeigte auch *RpoTm* eine deutlich höhere Transkriptakkumulation im weißen Gewebe (Abb. 14). Der durch Spectinomycin verursachte negative Effekt auf die plastidäre Translation und die Transkription durch PEP, könnte daher auch eine Wirkung auf die mitochondriale Transkription haben. Aus diesem Grund wurde nicht nur die Transkriptakkumulation weiterer plastidärer Gene, sondern auch einer großen Anzahl mitochondrialer Gene sowie nukleärer Gene mit Funktionen in den beiden Organellen analysiert.

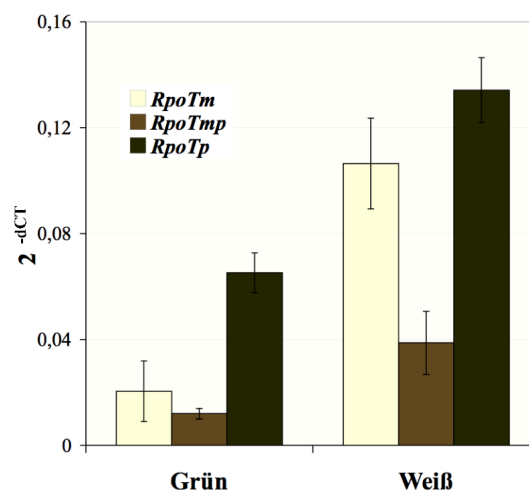


Abb. 14: Akkumulation der Transkripte von *RpoT* im grünen und chlorophylldefizienten Gewebe von *Arabidopsis thaliana*. Mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelte Transkriptmengen der *RpoT*-Gene im grünen und spectinomycinbehandelten Wildtyp-Gewebe. Die Werte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden standardisiert auf die jeweils detektierten Mengen cytosolischer 18S-rRNA und dargestellt als 2^{-dCT} (s. Kap. II.2.7.2).

Für die Untersuchung der Transkriptakkumulation in *Arabidopsis* wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Börner *Microarrays* mit 720 Sequenzen aus *Arabidopsis* für plastidäre und mitochondriale Gene, sowie nukleäre Gene mit Funktionen in den beiden Organellen hergestellt. In einer ersten Analyse wurden je 10 µg Gesamt-RNA aus grünem und chlorophylldefizientem Gewebe unter Verwendung von Random-Primern in cDNA umgeschrieben und auf die *Microarrays* hybridisiert (die Hybridisierung, das Scannen und die Auswertung erfolgten bei Herrn Dr. Hans Mollenkopf, MPI für Infektionsbiologie, Berlin). Abbildung 15 gibt einen groben Überblick über die Transkriptakkumulation in *Arabidopsis* unter Wirkung von Spectinomycin.

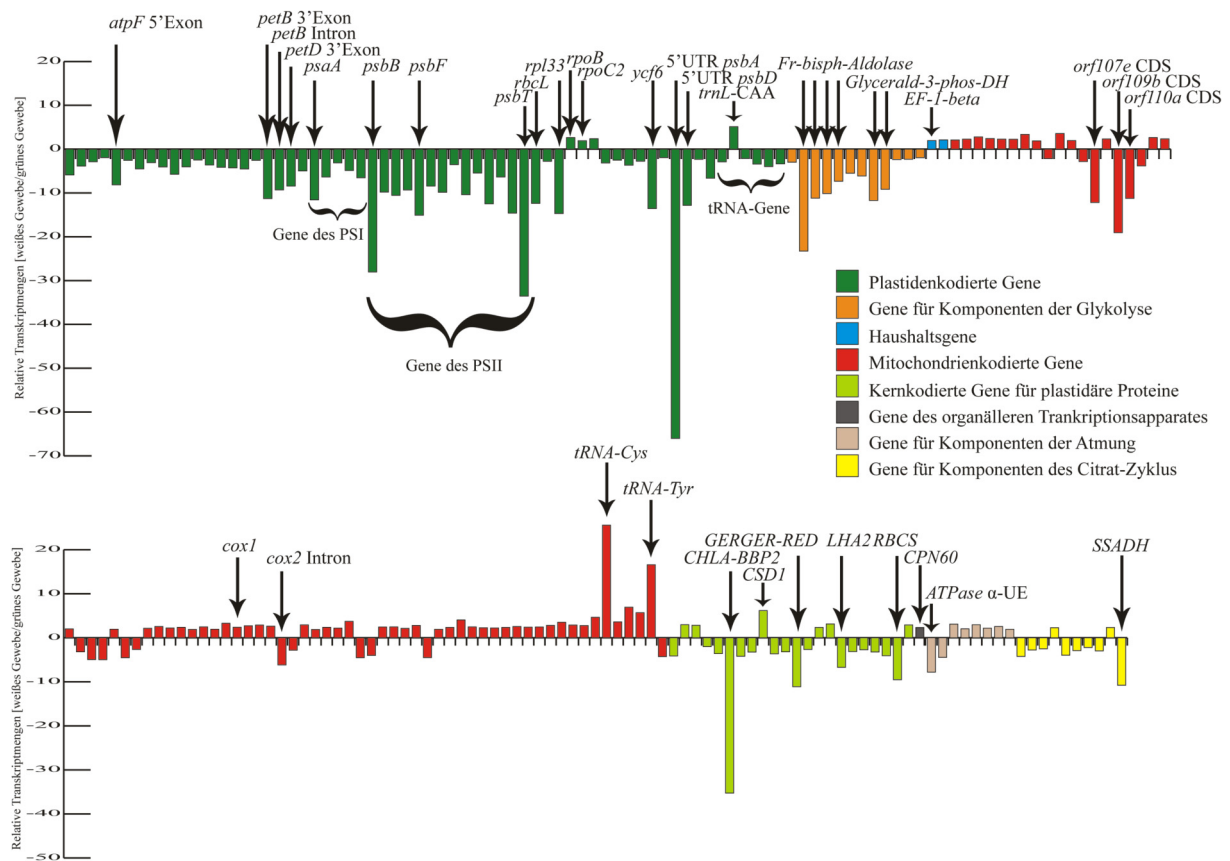


Abb. 15: Wirkung von Spectinomycin auf die Transkriptakkumulation in *Arabidopsis thaliana*. Gesamt-RNA aus grünen und chlorophylldefizienten Pflanzen wurde in cDNA umgeschrieben und auf *Microarrays* mit 720 Sequenzen für plastidäre und mitochondriale Gene sowie nukleäre Gene mit Funktionen in den beiden Organellen hybridisiert. Dargestellt sind nur Transkripte, die in veränderten Mengen in chlorophylldefizienten im Vergleich zu unbehandelten Wildtyppflanzen vorliegen. Transkripte, die besonders stark hoch/herunterreguliert sind, sind durch Pfeile und die entsprechenden Gennamen gekennzeichnet.

Es wird deutlich, dass die Transkriptmengen einer großen Anzahl der untersuchten Gene verändert sind. Im Vergleich zum grünen Gewebe akkumulieren im chlorophylldefizienten Gewebe die Transkripte plastidärer Gene (Abb. 15; dunkelgrüne Balken) mit wenigen Ausnahmen, wie z. B. NEP-transkribierte Gene (insbesondere das *rpoB*-Operon), zu deutlich geringerem Niveau. Vor allem die PEP-generierten Transkripte der Gene, welche die Komponenten des PS II kodieren, sind betroffen. Auch Transkripte von kernkodierten Genen mit Funktionen in Chloroplasten (hellgrüne Balken), wie z. B. *RBCS*, welches die kleine Untereinheit der RuBisCo kodiert, oder *CHLA-BBP2*, welches das in der Thylakoidmembran lokalisierte Chlorophyll-a/b-Bindeprotein kodiert, liegen in deutlich geringeren Mengen vor. Des Weiteren akkumulieren Transkripte nukleärer Gene mit Funktionen in der Glykolyse (orangefarbene Balken) und im Citrat-Zyklus (gelbe Balken) hauptsächlich auf einem geringeren Niveau. Im Gegensatz dazu akkumulieren die Transkripte mitochondrienkodierter Gene (rote Balken) und kernkodierter Gene für Komponenten der Atmung (rosa Balken) stärker im chlorophylldefizienten Gewebe im Vergleich zum grünen Gewebe.

Die verminderte Akkumulation von PEP-Transkripten im weißen Gewebe resultiert aus der fehlenden PEP-Aktivität. Die erhöhte Transkriptakkumulation NEP-transkribierter Gene weist auf eine verstärkte Transkriptionsaktivität der NEP im weißen Gewebe hin, was mit einer erhöhten Transkriptakkumulation der beiden Gene *RpoTp* und *RpoTmp* korreliert (Abb. 14). Spectinomycin hat nicht nur einen positiven Effekt auf die Transkriptakkumulation von *RpoTm* (Abb. 14), sondern auch auf die Akkumulation von Transkripten mitochondrienkodierter Gene (Abb. 15). Diese Daten verdeutlichen die vernetzte Regulation der Genexpression der drei getragenden Kompartimente in der Pflanzenzelle.

III.1.4 Analyse der Transkriptionsaktivität in weißen Plastiden

Die allgemein verstärkte Akkumulation von NEP-generierten Transkripten im weißen Gewebe (Abb. 13) und die erhöhte Expression plastidenlokalisierter Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTp* und *RpoTmp* (Abb. 14) lässt dort auf eine erhöhte Transkriptionsaktivität der NEP schließen. Um zu überprüfen, inwieweit diese detektierten Unterschiede der plastidären Transkripte im grünen und weißen Gewebe auf eine vermehrte (NEP) bzw. reduzierte (PEP) Transkriptionsaktivität zurückzuführen sind, wurde die transkriptionelle Aktivität einiger ausgesuchter Gene mittels der *run-on* Transkription in

Plastiden aus grünen- und chlorophylldefizienten Pflanzen untersucht. Darüber hinaus zeigten die *Microarray*-Analysen (Abb. 15) Hinweise auf eine unterschiedliche Akkumulation einiger plastidärer tRNAs. Während die stationären Mengen einzelner tRNAs in weißen, spectinomycinbehandelten Pflanzen im Vergleich zum grünen Wildtyp-Gewebe reduziert waren, akkumulierte die vom *trnL*^{CAA} Gen kodierte Lysin-tRNA im weißen Gewebe deutlich stärker (Abb. 15). Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der tRNA-Akkumulation auf eine veränderte Transkriptionsaktivität im weißen Gewebe zurückzuführen sind, wurden die tRNAs auf der Transkriptionsebene untersucht und daher in den *run-on* Analysen miteinbezogen (Abb. 16). Die RNA-Fraktion aus der *in vitro run-on* Transkription aus einer gleichen Anzahl Plastiden von 10 Tage alten grünen bzw. chlorophylldefizienten Pflanzen wurde auf eine *Dot Blot*-Membran mit entsprechenden DNA-Gensonden hybridisiert (Abb. 16c).

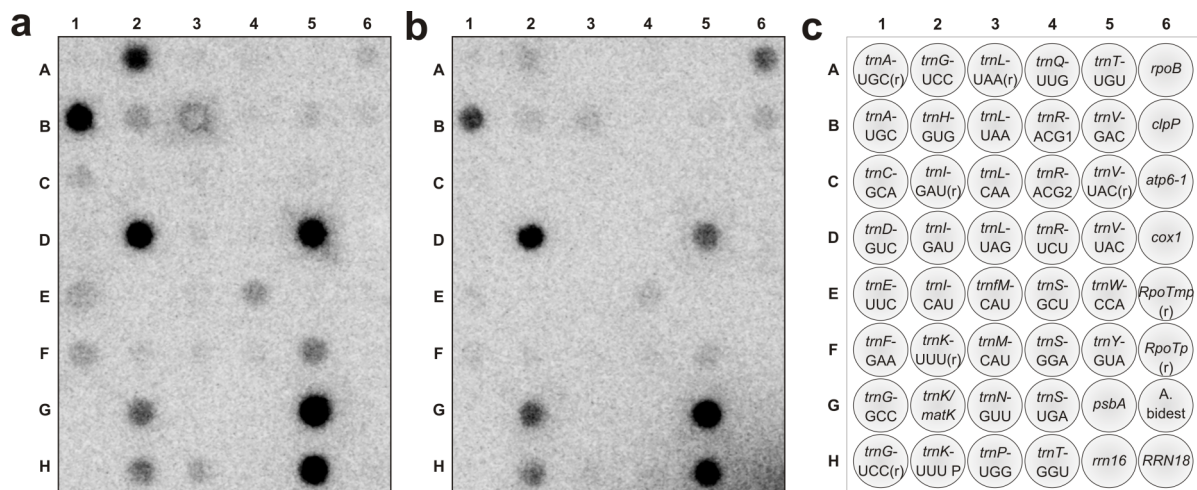


Abb. 16: Expressionsprofil in grünen (a) und chlorophylldefizienten Pflanzen (b). RNA-Fraktion aus der *in vitro run-on* Transkription lysierter Plastiden aus 10 Tage alten Pflanzen wurde auf die plastidäre tRNA-Gene und Kontrollgene repräsentierende *Dot Blot*-Membran hybridisiert. (c) Anordnung der DNA-Gensonden auf der *Dot Blot*-Membran (Kap. II.2.12.3).

Die Analyse der *run-on* Transkription zeigt eine Korrelation der relativen Transkriptionsaktivitäten von *psbA*, *rpoB* und *rrn16* (Abb. 16) mit der Promotorstärke des jeweiligen Gens (Liere und Maliga, 1999; Shen et al., 2001; Sriraman et al., 1998). Das bedeutet, dass die detektierten Mengen der *run-on* Transkripte der untersuchten Gene direkt die Transkriptionsaktivität des jeweiligen Gens *in vivo* in Plastiden widerspiegeln. Das PEP-transkribierte Gen *psbA* (vergl. Abb. 8b) wurde in chlorophylldefizienten Plastiden mit verringerter PEP-Aktivität vermindert transkribiert (Abb. 17, rechtes Panel). Im Gegensatz

dazu waren die relativen Transkriptionsraten des ausschließlich von der NEP transkribierten Gens *rpoB* (vergl. Abb. 10b) in weißen Plastiden deutlich höher als in grünen Chloroplasten (Abb. 17, rechtes Panel). Ähnlich dazu, wurde in weißen Plastiden eine erhöhte Transkriptionsaktivität von *clpP* beobachtet (Abb. 17, rechtes Panel), was mit einer erhöhten Akkumulation der *clpP*-Transkripte in chlorophylldefizienten Pflanzen korrelierte (vergl. Abb. 13c und Abb. 31b und d).

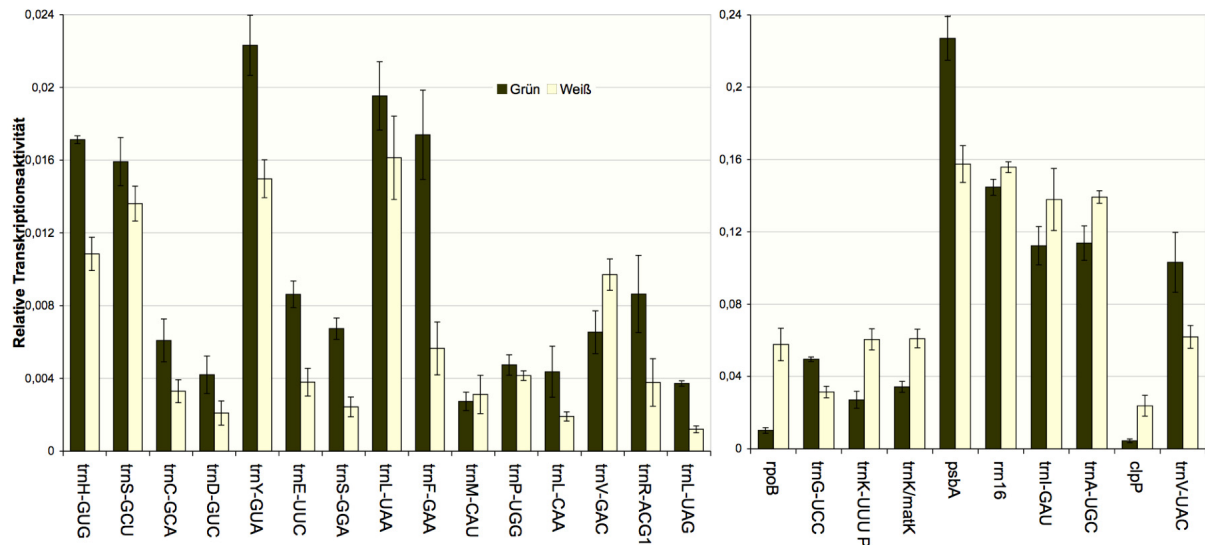


Abb. 17: Histogramm ermittelter relativer Transkriptionsraten für tRNA-Gene aus Plastiden aus grünem (dunkle Balken) und chlorophylldefizientem Gewebe (helle Balken) von *Arabidopsis thaliana*. Für den Vergleich beider Gewebe wurde in der *run-on* Analyse die gleiche Anzahl von Plastiden aus 10 Tage alten grünen und weißen Keimlingen eingesetzt. Die Werte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden mittels der Computersoftware *QuantityOne*® (BioRad) detektiert und aufgrund unterschiedlicher Wertebereiche in zwei Diagrammen zusammengefasst.

Stromaufwärts der Gene *trnG*^{UCC} und *trnV*^{UAC} wurden Promotorsequenzen eubakteriellen Typs lokalisiert (Kanamaru und Tanaka, 2004). Beide Gene wurden in grünen Chloroplasten stark transkribiert (Abb. 16). In weißen Plastiden mit stark reduzierter PEP-Aktivität waren ihre Transkripte dagegen deutlich verringert (Abb. 17, rechtes Panel) - wobei die von *trnG*^{UCC} stärker betroffen waren als die von *trnV*^{UAC}. Auch für die Gene *trnH*^{GUG}, *trnS*^{GCU}, *trnC*^{GCA}, *trnD*^{GUC}, *trnY*^{GUA}, *trnE*^{UUC}, *trnS*^{GAA}, *trnL*^{UAA}, *trnF*^{GAA}, *trnP*^{UGG}, *trnR*^{ACG1} und *trnL*^{UAG} wurden verringerte bis leicht verringerte relative Transkriptionsraten in weißen Plastiden im Vergleich zu grünen Chloroplasten deutlich (Abb. 17, linkes Panel). Vergleichbar damit, war auch die relative Transkriptionsaktivität von *trnL*^{CAA} verringert in weißen Keimlingen (Abb. 17, linkes Panel), obwohl die entsprechende Lysin-tRNA deutlich

erhöht akkumulierte (Abb. 15). Die Transkription von *trnM*^{CAU} blieb hingegen unverändert (Abb. 17, linkes Panel).

Die Sequenz des Gens *trnK*^{UUU} ist durch ein Intron unterbrochen (Liere und Link, 1995). Innerhalb dieses Introns ist das Gen *matK* lokalisiert. Um Unterschiede in der Transkription zwischen *trnK*^{UUU} und *matK* detektieren zu können, wurden zwei genspezifische Amplifikate, welche unterschiedliche Regionen abdecken, auf die *Dot Blot*-Membran gebracht (Abb. 16, „*trnK*-UUU P“: Positionen -89 stromaufwärts des kodierenden Bereichs bis +34 ins Exon 1; „*trnK/matK*“: Positionen 995 bis 1239 im kodierenden Bereich von *matK*). Die Transkription beider Regionen war in weißen Plastiden stärker (Abb. 17, rechtes Panel). Dies könnte aus der NEP- Transkriptionsaktivität von *trnK*^{UUU} herrühren (vergl. Abb. 19a). Auch *trnV*^{GAC} (Abb. 17, linkes Panel) sowie die innerhalb des *rrn16*-Operons kodierten Gene *rrn16*, *trnI*^{GAU} und *trnA*^{UGC} (Abb. 17, rechtes Panel) werden in chlorophylldefizienten Plastiden stärker transkribiert als in grünen Chloroplasten, was auf eine Transkription durch die NEP schließen lässt. Sechs der tRNA-Gene sind durch ein Intron unterbrochen. Für diese tRNAs wurden die reifen Transkripte nicht detektiert.

Obwohl die Transkriptionsaktivität in weißen im Vergleich zu grünen Plastiden allgemein verringert war, war sie doch höher als sich aus den Analysen der Transkriptakkumulation mittels *Microarrays* (Abb. 15) sowie der Transkriptionsinitiation von *psbA* (Abb. 8b und Abb. 13c) und vor allem aus dem drastischen Phänotyp der Pflanzen (Abb. 7) schließen lässt. Besonders die relativen Transkriptionsraten von *psbA* waren in weißen Plastiden höher als erwartet (vergl. Abb. 8). Dies könnte möglicherweise durch die NEP-Transkriptionsaktivität des stromaufwärts lokalisierten *trnK*^{UUU} Gens hervorgerufen werden (Abb. 17, rechtes Panel). Untersuchungen von Senf und *Arabidopsis* haben gezeigt, dass geringe Mengen der Transkripte von *psbA* mit den Sequenzen von *trnK* co-transkribiert werden (Liere et al., 1995; Nickelsen und Link, 1991). Die Analyse der *run-on* Transkription zeigt, dass auch in weißen Plastiden ohne PEP-Aktivität eine aktive, wenn auch leicht verminderte, Transkription plastidärer Gene stattfindet, die höchstwahrscheinlich durch die NEP-Transkriptionsaktivität getrieben wird, um die Plastidenbiogenese zu gewährleisten.

III.1.5 Charakterisierung von Transkriptionsstartpunkten plastidärer tRNA-Gene

Nur für die wenigsten plastidären tRNAs sind bisher Promotoren kartiert worden (Übersicht in Liere und Börner, 2007). Für die Kartierung von Orten der plastidären tRNA-

Transkriptionsinitiation in *Arabidopsis* wurden 14 tRNA-Gene ausgewählt. Da die Analyse der plastidären Transkriptionsaktivität gezeigt hatte, dass auch im weißen spectinomycinbehandelten Blattgewebe plastidäre tRNA-Gene transkribiert werden (Kap. III.1.4), wurden für die 5'-*RACE* Analyse der Promotorregionen plastidärer tRNA-Gene RNAs aus grünem und weißem Blattgewebe sowie Blühmeristem verwendet. Im Folgenden werden einige ausgewählte Promotoren plastidärer tRNA-Gene detaillierter beschrieben. Alle kartierten Transkriptionsstartpunkte sind in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Für die meisten tRNA-Gene wurden Promotoren mit typischen -35/-10 Konsensusmotiven von PEP-Promotoren lokalisiert. Dazu gehören z. B. die Gene *trnfM*^{CAU} und *trnG*^{UCC}. In der Kartierung von *trnfM*^{CAU}, welches die Formylmethionin-tRNA kodiert, wurde in der RNA aus grünem Blattgewebe ein PCR-Produkt der Größe von 116 bp detektiert, das einem primären 5'-Ende an der Position -72 entsprach (Abb. 18a, +T^G). Direkt stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt wurden Promotorkonsensusmotive von PEP-Promotoren lokalisiert. Aus diesem Grund wurde der Promotor *PtrnfM*-72 der Gruppe der PEP-Promotoren zugeordnet (Abb. 40a). Dieses native 5'-Ende wurde, wenn auch um ein vielfaches schwächer, auch in der RNA aus dem weißen Gewebe (+T^W) detektiert, was auf einen PEP-Promotor hinweist. Ein weiteres PCR-Produkt der Größe von 80 bp aus der +T^W-Probe wurde auch im Kontrollansatz (Abb. 18a, -T) lokalisiert und entspricht daher höchstwahrscheinlich einem prozessierten RNA-5'-Ende. Die Detektion der Sequenz des dritten PCR-Produktes aus dem weißen Blattgewebe (Abb. 18a, +T^W, Stern) war nicht erfolgreich.

Das *trnG*^{UCC} Gen kodiert eine Glycin-tRNA. Die kodierende Sequenz dieses Gens ist durch ein Intron unterbrochen (Meng et al., 1991). In Tabak wird *trnG* von einem hoch konservierten PEP-Promotor transkribiert (*PtrnG*-6; Deno und Sugiura, 1984). Aus grünem Blattgewebe konnte ein *trnG*^{UCC}-spezifisches Produkt der Größe von 121 bp isoliert werden (Abb. 18b, +T^G). Der Transkriptionsstartpunkt wurde in der Sequenzanalyse an der Position -3 platziert. Ähnlich wie für *trnfM*, wurden auch hier direkt stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt Promotorkonsensusmotive von PEP-Promotoren lokalisiert. Diese Beobachtung machte eine Zuordnung des Promotors *PtrnG*-3 in die Gruppe der PEP-Promotoren möglich (Abb. 40a). Im weißen Blattgewebe wurden zwei PCR-Signale der Größen 130 bp und 115 bp detektiert (Abb. 18b, +T^W). Das größere Produkt entsprach einem primären 5'-Ende an der Position -15. Interessanterweise ist dieses native 5'-Ende der RNA Teil des Motivs TATATGCAA mit Sequenzähnlichkeit zu Typ-I NEP-Promotoren (Abb. 40b). Eine solche Zuordnung wurde bisher noch nicht beschrieben. Die

Sequenzanalyse des kleinen Produktes (Abb. 18b, +T^W, Stern) dagegen platzierte das RNA-5'-Ende an der Position +24, die dem ersten Nukleotid des Introns entspricht.

Für einige tRNA-Gene konnten weder im grünen noch im weißen Blattgewebe primäre Transkripte detektiert werden. Aus diesem Grund wurden für die Kartierung weitere Gewebearten verwendet. Da tRNAs einer schnellen Prozessierung unterliegen (Liere und Link, 1994; Liere und Börner, 2007; Neuhaus und Link, 1987), wurde versucht, die 5'-Enden dieser tRNAs zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der Plastidenentwicklung zu identifizieren. So wurden neben vier Tage alten grünen Keimlingen und noch nicht gekeimten Samen (Daten für beide nicht gezeigt), auch sieben Tage alte bei 10°C auf Spectinomycin angezogene Keimlinge untersucht.

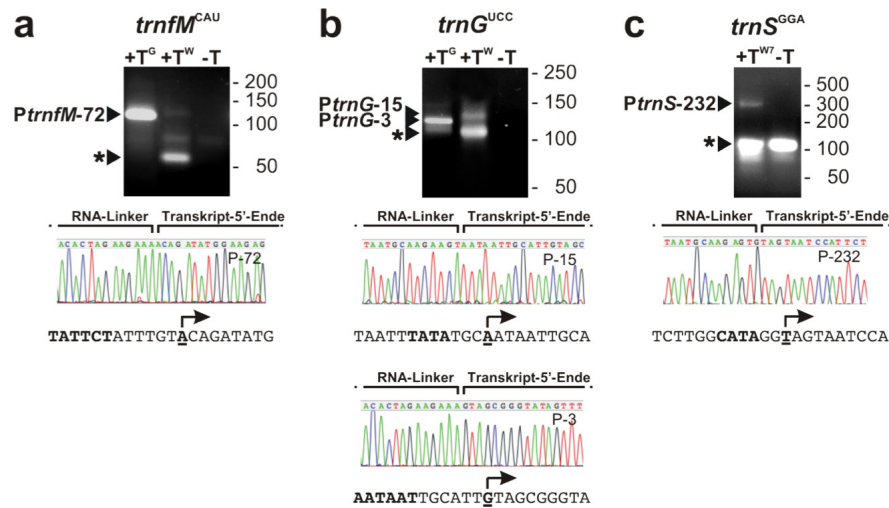


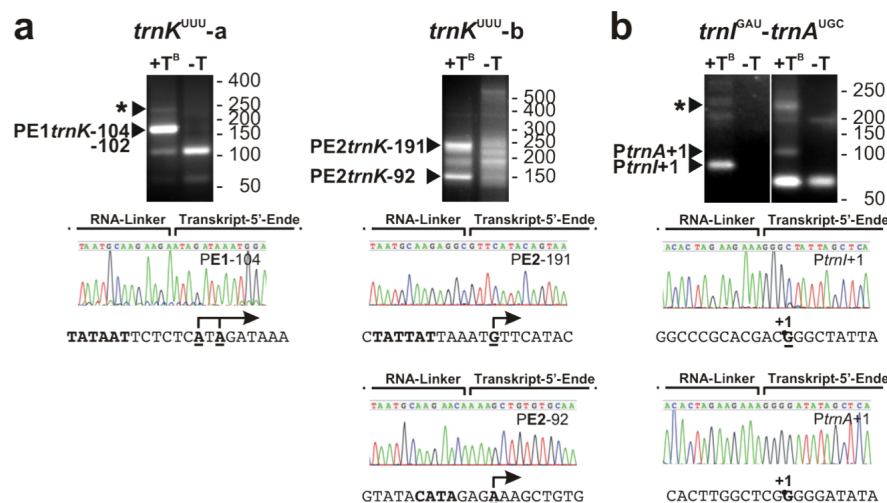
Abb. 18: Plastidäre tRNA-Gene werden in Arabidopsis nicht nur an PEP-Promotoren transkribiert. Genspezifische 5'-RACE-Produkte für *trnM*^{CAU} (a), *trnG*^{UCC} (b) und *trnS*^{GGA} (c) aus grünem (+T^G) und weißem (+T^W) Blattgewebe sowie sieben Tage alten bei 10°C angezogenen weißen Keimlingen (+T^{W7}) wurden längsseits eines Molekulargewichtsmarkers im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (oben). Die Größen sind in bp angegeben. Im Kontrollversuch wurden die RNAs nicht mit der TAP (-T) behandelt. Primären Transkripten entsprechende Produkte sind durch Pfeile und Namen der entsprechenden Promotoren gekennzeichnet (vergl. Tab. 10). Chromatogramme zeigen Sequenzen an der Ligationstelle der 5'-RACE-Produkte. RNA-Linker und Transkript-5'-Enden sind markiert. Sequenzen der Promotorregionen beinhalten putative Promotormotive (fett markiert). Transkriptionsstartpunkte sind unterstrichen (unten).

In sieben Tage alten bei 10°C auf Spectinomycin angezogenen Keimlingen konnte in der 5'-RACE Analyse des Gens *trnS*^{GGA}, welches eine plastidäre Serin-tRNA kodiert, ein PCR-Produkt der Größe 191 bp amplifiziert werden, das einem nativen 5'-Ende an der Position -232 entsprach (Abb. 18c, +T^{W7}). Dieses ist Teil der Sequenz CATAGGTA mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Konsensusmotiv von Typ-I NEP-Promotoren (Abb. 40b).

Diese Daten zeigen, dass eine mögliche Transkription von tRNA-Genen durch die NEP gewebspezifisch sein könnte. Ein weiteres PCR-Produkt der Größe ca. 110 bp wurde ebenfalls in der TAP-unbehandelten Kontrollprobe (-T) detektiert und entspricht daher möglicherweise einem prozessierten RNA-5'-Ende (Abb. 18c, Stern).

Das plastidäre Gen *trnK^{UUU}*, welches die Lysin-tRNA kodiert, ist durch ein Intron der Gruppe IIA unterbrochen (Vogel et al., 1997). Im Bereich zwischen dem 5'- und dem 3'-Exon von *trnK^{UUU}*, der in Arabidopsis eine Länge von 2474 nt besitzt, ist das Gen *matK* lokalisiert. MatK ist die einzige Maturase von Gruppe-II Introns, die im Chloroplastengenom kodiert ist (Neuhaus und Link, 1987). In der 5'-RACE Analyse von *trnK^{UUU}* sollte untersucht werden, ob das *matK* Gen möglicherweise von einem eigenen Promotor transkribiert wird. Aus diesem Grund wurden in dieser Untersuchung mehrere Oligonukleotide verwendet, welche den gesamten kodierenden Bereich von *trnK^{UUU}* und *matK* abdeckten. In keinem der verwendeten Blattgewebe konnte ein natives 5'-Ende von *matK* detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus dem Blühmeristem wurde jedoch ein abundantes 166 bp großes PCR-Fragment isoliert (Abb. 19a, *trnK^{UUU}*-a, +T^B). Die Sequenzanalyse platzierte das native 5'-Ende als eine Gruppe an die Positionen -104 und -102. Direkt stromaufwärts wurden typische -35/-10 Promotorkonsensusmotive von PEP-Promotoren lokalisiert. Aus diesem Grund wurde dieser Promotor (in der Abb. 19a als **PE1***trnK*-104 bezeichnet) in die Gruppe der PEP-Promotoren eingeordnet (Abb. 40a). Die Sequenz von *trnK^{UUU}* ist in höheren Pflanzen hoch konserviert. So wird *trnK^{UUU}* in Senf auch von einem PEP-Promotor transkribiert (Abb. 40a; SaPtrnKUUU-121; Neuhaus und Link, 1987). Interessanterweise wurden im Blühmeristem unter Verwendung weiterer Primer zwei zusätzliche PCR-Produkte der Größen 241 bp und 142 bp identifiziert, die primären Transkripten entsprachen (Abb. 19a, *trnK^{UUU}*-b, +T^B). Die Sequenzanalyse platzierte beide RNA-5'-Enden im nicht-kodierenden Bereich zwischen *matK* und dem 3'-Exon von *trnK^{UUU}*. Das größere PCR-Fragment entsprach einem primären RNA-5'-Ende an der Positionen -191 stromaufwärts von *trnK^{UUU}* Exon 2. Das kleinere PCR-Fragment wurde einem nativen 5'-Ende an der Position -92 stromaufwärts vom Exon 2 von *trnK^{UUU}* zugeordnet. Während stromaufwärts von **PE2***trnK*-191 Motivelemente eines PEP-Promotors gefunden wurden (Abb. 40a), konnten stromaufwärts von **PE2***trnK*-92 Sequenzelemente mit Ähnlichkeiten zu Typ-I NEP-Promotoren lokalisiert werden (Abb. 40b). Wie bereits erwähnt (vergl. Kap. III.1.4), wurde von Liere et al. (1995) in Arabidopsis eine Co-Transkription von *trnK^{UUU}* mit *psbA* beschrieben. Zusätzliche, im Intron lokalisierte

Die plastidären tRNA-Gene *trnI*^{GAU} und *trnA*^{UGC}, welche eine Isoleucin-tRNA und eine Alanin-tRNA kodieren, sind in Arabidopsis im intergenischen Bereich zwischen *rrn16* und *rrn23* innerhalb des Genclusters der ribosomalen RNAs lokalisiert (Sato et al., 1999). Beide Gene sind durch Intronen der Gruppe IIA unterbrochen. Die Co-Transkription der Gene des rRNA-Operons resultiert in langen polycistronischen Vorläufermolekülen, aus denen monocistronische Transkripte einzelner Gene entlassen werden (Kössel et al., 1985).



In der 5'-RACE Analyse beider Gene konnten weder im grünen, noch im weißen Blattgewebe primäre Transkripte detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dafür konnte im Blühmeristem unter Verwendung unterschiedlicher Oligonukleotide für *trnI*^{GAU} ein PCR-Produkt der Größe 81 bp (Abb. 19b, +T^B, links) und für *trnA*^{UGC} ein PCR-Produkt der Größe 104 bp detektiert werden (Abb. 19b, +T^B, rechts). Beide PCR-Fragmente wurden nicht in der TAP-unbehandelten RNA (Abb. 19b, -T) lokalisiert und scheinen somit primären Transkripten zu entsprechen. Die Sequenzanalyse platzierte beide RNA-5'-Enden an der Position +1. Direkt stromaufwärts wurden keine Motive mit Sequenzähnlichkeiten zu

bekannten Promotoren lokalisiert. Die Detektion der Sequenz der größeren PCR-Produkte war nicht erfolgreich (Abb. 19b, +T^B, Stern).

Die Beobachtung, dass plastidäre tRNA-Gene möglicherweise auch durch die NEP transkribiert werden können, zeigt die Komplexität der plastidären Genexpression im Bezug auf die Aufgabenteilung zwischen der PEP und der NEP. Die Resultate dieser Analyse zeigen, dass die Transkription auch an der Position +1 der kodierenden Sequenz initiiert werden kann. Diese Beobachtung macht weitere Untersuchungen zur Transkriptionsinitiation in verschiedenen Geweben, die Stressfaktoren ausgesetzt die plastidäre Genexpression auf Umwegen gewährleisten müssen, notwendig.

Tab. 10: Mittels 5'-RACE Analyse detektierte Transkriptionsstartpunkte plastidärer tRNA-Gene von *Arabidopsis thaliana*.^b

Gen	Promotor	Sequenz	Anzahl der Klone			
			+T ^G	+T ^W	+T ^B	+T
<i>trnK</i> ^{UUU}	PE2 <i>trnK</i> -191	TATTTCT TATTAT TAAAT G TTCATACA	n.d.	n.d.	5/8	/
<i>trnV</i> ^{GAC}	<i>PtrnV</i> -22	TTGACT TAGGAT TAGTC AG TTCTATT	10/16	n.d.	/	/
<i>trnK</i> ^{UUU}	PE1 <i>trnK</i> -104 ^a	CCAAAT TATAAT TCTCTC AT AGATAAA	15/16	n.d.	15/16	/
<i>trnM</i> ^{CAU}	<i>PtrnM</i> -44 ^a	GGATTT TATAAT CCCTATC GATG TGATA	9/9	n.d.	/	/
<i>trnT</i> ^{GGU}	<i>PtrnT</i> -50	ATATTT TAATAT ATATAT A TATATAGA	n.d.	n.d.	6/8	/
<i>trnC</i> ^{GCA}	<i>PtrnC</i> -138	TTTCT TAATAT TATTAG AA ATAAAAA	7/8	n.d.	/	8/8 ^{G4}
<i>trnG</i> ^{UCC}	<i>PtrnG</i> -3	TATGC AAATAAT TGCATT G TAGCGGGT	8/8	n.d.	/	/
<i>trnfM</i> ^{CAU}	<i>PtrnfM</i> -72	TAGGC TATTC TATTTGT AC AGATATG	13/13	6/8	7/8	5/8 ^S
<i>trnE</i> ^{UUC}	<i>PtrnE</i> -27 ^a	CTGAT CATACT ATGATC AT AGTATGA	21/23	n.d.	6/6	8/8 ^{W710°C}
<i>trnL</i> ^{UAA}	<i>PtrnL</i> -143	ATGAT AGAAT CTTTGT G ATTAGACT	8/8	n.d.	5/5	/
<i>trnC</i> ^{GCA}	<i>PtrnC</i> -221	CTGTT TATAAT TTAAATT GA AGAAGAT	15/18	n.d.	9/12	8/8 ^S
<i>trnT</i> ^{GGU}	<i>PtrnT</i> -33	ATATAT AGATTTTATTT ACT ACCGGC	8/8	n.d.	6/8	8/8 ^{G4}
<i>trnS</i> ^{GGA}	<i>PtrnS</i> -232	CGCGATCTTGG CATAGG TAGTAATCC	n.d.	n.d.	n.d.	8/8 ^{W710°C}
<i>trnK</i> ^{UUU}	PE2 <i>trnK</i> -92	TCTATGTATAC CATAGAG AAAGCTGTG	n.d.	4/8	10/16	8/8 ^{W710°C}
<i>trnG</i> ^{UCC}	<i>PtrnG</i> -15	AAGGTTAATTT TATAT TGC AA TAATTGC	n.d.	7/8	/	/
<i>trnG</i> ^{GCC}	<i>PtrnG</i> -130 ^a	ATAATATATAT TATATAT ATT AA TAGA	n.d.	n.d.	5/8	/
<i>trnT</i> ^{GGU}	<i>PtrnT</i> -46 ^a	TTAATATATAT TATATAT ATAGATTTT	n.d.	10/16	n.d.	/
<i>trnE</i> ^{UUC}	<i>PtrnE</i> +1	GGCGGTTGAGCAAGTAT G CCCCCATC	n.d.	6/8	n.d.	7/8 ^S
<i>trnM</i> ^{CAU}	<i>PtrnM</i> +1	CTTTACAATGATAAA TA ACCTACTTA	n.d.	7/8	/	7/8 ^S
<i>trnL</i> ^{UAA}	<i>PtrnL</i> +1	AATGAGATCCTAAAA AG GGGATATG	n.d.	n.d.	n.d.	7/8 ^S , 19/19 ^{W710°C}
<i>trnV</i> ^{UAC}	<i>PtrnV</i> +1	TGTGTATCACAAACACA AG GGGCTATA	n.d.	n.d.	8/8	/
<i>trnT</i> ^{GGU}	<i>PtrnT</i> +1	GGAATTAAACCAAGAC G CCCTTTTA	n.d.	n.d.	n.d.	8/8 ^{G4}
<i>trnI</i> ^{GAU}	<i>PtrnI</i> +1	CAGGAGGCCCGCACGAC G GGCTATTA	n.d.	n.d.	8/8	/
<i>trnA</i> ^{UGC}	<i>PtrnA</i> +1	ATGCTCCACTTGGCTCG G GGGATATA	n.d.	5/8	6/6	/

^a Die Transkriptionsinitiation erfolgt an mehr als einem Nukleotid in einer Promotorregion. Die angegebene Häufigkeit ergibt sich aus der Summe der Häufigkeiten aller Transkriptionsstartpunkte an diesem Promotor. n.d., nicht detektiert; W710°C, weiße 7 Tage alte bei 10°C auf Spectinomycin angezogene Keimlinge; G4, grüne 4 Tage alte Keimlinge; S, Samen.

^b Nukleotide, an denen die Initiation stattfindet, sind unterstrichen. Promotormotive sind fett markiert. Die Anzahl der sequenzierten Klone für jeden Promotor ist angegeben zusammen mit der Häufigkeit des Auftretens des jeweiligen Transkript-5'-Endes, wie es in der TAP-behandelten RNA aus dem grünen (+T^G) und weißen (+T^W) Blattgewebe sowie dem Blüheristem (+T^B) und den weiteren Gewebearten detektiert wurde.

Die identifizierten Transkriptionsstartpunkte der plastidären tRNA-Gene mit der sie umgebenden Sequenz sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Angegeben ist für jeden

Promotor die Häufigkeit des Auftretens des jeweiligen Transkript-5'-Endes in TAP-behandelten Proben für grünes (+T^G, vierte Spalte) und weißes (+T^W, fünfte Spalte) Blattgewebe, sowie das Blühmeristem (+T^B, sechste Spalte) im Gesamtpool der sequenzierten Klone. In der letzten Spalte (+T) der Tabelle 10 ist die in den jeweils verschiedenen Gewebearten detektierte Anzahl der Klone angegeben - weiße sieben Tage alte bei 10°C auf Spectinomycin angezogene Keimlinge (^{W710°C}), grüne vier Tage alte Keimlinge (^{G4}) sowie noch nicht gekeimte Samen (^S).

III.1.6 Bestimmung der Plastomkopienzahl im chlorophylldefizienten Gewebe

Die Analysen der Transkriptakkumulation (Kap. III.1.3) und Transkriptionsaktivität (Kap. III.1.4) ausgewählter plastidärer Gene haben gezeigt, dass plastidäre Genexpression im chlorophylldefizienten Gewebe in verringertem Ausmaß erfolgt. Um zu überprüfen, ob die verringerte Genexpression in weißen Plastiden in einem Zusammenhang mit eventuellen Veränderungen der plastidären DNA-Menge steht, wurde die Plastomkopienzahl des chlorophylldefizienten Gewebes untersucht.

Für die Untersuchung der Plastomkopienzahl wurde die Anzahl von vier Plastidengenen mittels quantitativer *real-time*-PCR analysiert (s. Kap. II.2.7.2). Um die möglichen dynamischen Effekte wie spezifische Replikation oder Degradation bestimmter Regionen des Plastoms auszuschließen, wurden vier plastidäre Gene ausgewählt, die weit auseinander auf dem Plastom lokalisiert sind. Für den großen Einzelkopiebereich (LSC, vergl. Abb. 1) waren es die Gene *psbA* und *clpP*, für den kleinen Einzelkopiebereich (SSC) das Gen *ndhH* und für die zwei identischen, gegenläufigen Sequenzabfolgen das Gen *rrn16*. Das nukleäre Gen für die 18S-rRNA diente als interner Standard. Dieses Gen liegt in mehreren Kopien im Zellkern vor. Seine Kopienzahl wurde mit 1400 für eine diploide Zelle (*Arabidopsis*-Genome-Initiative, 2000; Copenhaver und Pikaard, 1996) und 700±60 pro haploides Genom von *Arabidopsis* (Zoschke et al., 2007) beschrieben. Das Zellwachstum der Blattspreiten geht in *Arabidopsis thaliana* mit einem Anstieg der Ploidie des nukleären Genoms einher (Kozuka et al., 2005). Aufgrund dieser Endopolyploidisierung ist es daher notwendig, für die genaue Bestimmung der Plastomkopienzahl den nukleären DNA-Gehalt der Zelle zu kennen. Zur Bestimmung des Ploidiegrades der Zellkerne wurde mit unabhängigen Blattproben des grünen und chlorophylldefizienten Gewebes Durchflusszytometrie (Barow und Meister, 2003) durchgeführt. Die ermittelten C-Werte (vergl. II.2.14) wurden freundlicherweise von Herrn Tobias Preuten zur Verfügung gestellt. Während die Zellkerne

des 21 Tage alten grünen Blattgewebes tetraploid (4C) waren, wurden in gleichaltrigen chlorophylldefizienten Pflanzen hexaploide (6C) Zellkerne detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Endopolyploidie ist vergleichbar mit anderen Untersuchungen von *Arabidopsis* (Zoschke et al., 2007).

Die Analyse der Anzahl der Einzelkopiegene *psbA*, *clpP* und *ndhH* zeigte nur geringe Unterschiede in der relativen DNA-Menge, welche vermutlich durch die unterschiedliche Effizienz der Primerbindung während der PCR verursacht wurden. Wie erwartet, war die relative DNA-Menge des in zwei Genkopien vorliegenden Gens *rrn16* doppelt so hoch, wie die der drei Einzelkopiegene (Abb. 20).

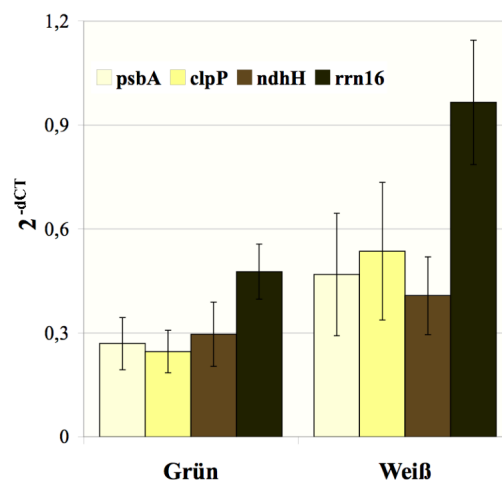


Abb. 20: Analyse des relativen DNA-Gehalts der plastidären Gene *psbA*, *clpP*, *ndhH* und *rrn16* von *Arabidopsis thaliana* im grünen und chlorophylldefizienten Gewebe. Mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelte DNA-Mengen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden auf die jeweils detektierten Mengen nukleärer 18S-rRNA standardisiert und dargestellt als $2^{-\Delta CT}$ (s. Kap. II.2.7.2).

Die Plastomkopienzahl in grünen und chlorophylldefizienten Pflanzen wurde aus den ermittelten $2^{-\Delta C_T}$ -Werten der vier untersuchten plastidären Gene (Abb. 20), der Kopienzahl des Gens für 18S-rRNA (700; Zoschke et al., 2007) und der C-Werte (von T. Preuten zur Verfügung gestellt) berechnet. Die bestimmten Werte deuten auf eine Wirkung von Spectinomycin auf die Plastomkopienzahl hin. Während in grünen Pflanzen ca. 800 Plastomkopien pro Zelle ermittelt wurden, schwankte in gleichaltrigen spectinomycinbehandelten, chlorophylldefizienten Pflanzen der Mittelwert um 2000 (Abb. 21). Dieser Wert liegt damit nicht nur über dem Wert für grüne *Arabidopsis*blätter, sondern auch deutlich über den bisher bekannten Daten für nicht-grüne Plastiden höherer Pflanzen.

Im nicht-photosynthetisierenden Gewebe von Spinat, Weizen und Arabidopsis wurde eine Verringerung der Plastom-DNA im Vergleich zum grünen Gewebe beobachtet (Aguettaz et al., 1987; Isono et al., 1997; Miyamura et al., 1990). Die verminderte Genexpression in weißen Plastiden hängt damit eindeutig nicht mit einer Verringerung der plastidären DNA-Menge zusammen, sondern höchstwahrscheinlich mit der starken Reduktion der PEP (s. Kap. III.1.2 sowie Abb. 13).

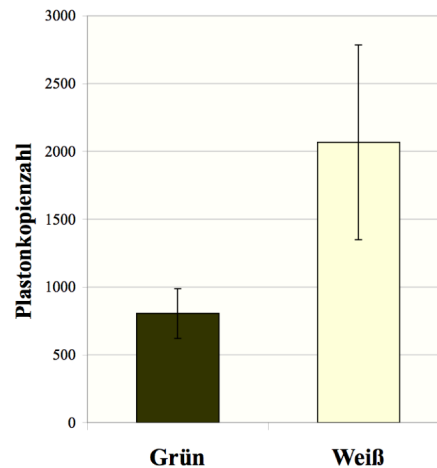


Abb. 21: Spectinomycin führt zur Erhöhung der Plastomkopienzahl in *Arabidopsis thaliana*. Plastomkopienzahlen pro Zelle wurden im 21 Tage alten grünen und chlorophylldefizienten Gewebe ermittelt (siehe Text).

III.2 Analyse der Transkriptionsregulation

III.2.1 Analyse der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen

Untersuchungen von Emanuel *et al.* (2005) zeigten, dass die Expression der *RpoT*-Gene auf RNA-Ebene der Entwicklungskontrolle der Pflanze unterliegt. *RpoTm* und *RpoTnp* wurden im gleichen Maß vor allem in Geweben mit hoher Mitochondrienaktivität stark exprimiert. Im Gegensatz dazu erfolgte die höchste Expression von *RpoTp* in grünen Geweben. Des Weiteren wurde für die *RpoTnp* eine deutliche Abnahme der relativen Transkriptmenge im Verlauf der Entwicklung gezeigt, während die relative Transkriptmenge von *RpoTp* konstant blieb (Emanuel et al., 2005). Um mehr über die Wirkung äußerer Einflüsse auf die Phagentyp-RNA-Polymerasen zu erfahren, wurde ihre Expression unter verschiedenen Lichtregimes und weiteren veränderbaren Bedingungen wie

veränderte Salzkonzentration und die Gegenwart von Spectinomycin als Inhibitor der plastidären Translation analysiert.

III.2.1.1 Regulation der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen durch Licht

Licht ist einer der entscheidenden Faktoren, welche das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze unter den vorherrschenden Umweltbedingungen regulieren (Casal et al., 2004). Zur Untersuchung der Auswirkung verschiedener Lichtbedingungen auf die Transkription der kernkodierten Phagentyp-RNA-Polymerasen wurde die histochemische β -Glukuronidase Analyse (*GUS*-Assay) durchgeführt. Hierfür wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit integrierten *GUS*-Fusionskonstrukten mit unterschiedlichen Längen der 5'-Promotorregionen von *RpoTmp* und *RpoTp* verwendet (*PRpoTmp::GUS*, *PRpoTp::GUS*). An der Regulierung der Genexpression können *cis*-Elemente beteiligt sein, welche an verschiedenen Positionen in der Promotorregion lokalisiert sein können. Um potentielle regulatorische Regionen einzugrenzen, wurden je zwei verschiedene Promotorlängen ausgewählt (*PRpoTmp::GUS* - 2238 bp und 765 bp, *PRpoTp::GUS* - 3420 bp und 2025 bp). Die Pflanzen wurden freundlicherweise durch Frau Dr. Carola Emanuel (HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die *RpoTmp*-Promotoren zeigten bereits im Keimlingsstadium einen starken Effekt in der *GUS*-Expression (Emanuel et al., 2005). Die *RpoTmp*-getriebene *GUS*-Aktivität war deutlich in der Streckungs- und Teilungszone der Wurzelspitzen sichtbar. Aus diesem Grund wurden die im Normallicht unter Langtagkonditionen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) angezogenen *PRpoTmp::GUS*-Keimlinge im Alter von vier Tagen unterschiedlichen Lichtbedingungen ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *GUS*-Expression von der Länge des *RpoTmp*-Promotors anhängig ist (Abb. 22a). So war die *GUS*-Färbung in der Wurzelspitze deutlich stärker in Keimlingen mit dem Promotorfragment der Länge 2238 bp (Position -2238 bp bis -1 der 5'-UTR von *RpoTmp*; Abb. 22a, B1) als in Keimlingen mit dem Promotorfragment der Länge 756 bp (Position -756 bp bis -1 der 5'-UTR von *RpoTmp*; Abb. 22a, B2). In den Kotyledonen beider Pflanzen konnte keine *GUS*-Färbung beobachtet werden (Abb. 22a, A1 und A2). Die Expression von *GUS* unter der Kontrolle des *RpoTp*-Promotors hingegen wurde erst nach einer Woche beobachtet. So konnte in sieben Tage alten *PRpoTp::GUS*-Keimlingen unabhängig von der Promotorlänge nur in Primärblättern eine schwache *GUS*-Färbung detektiert werden (Abb. 22b, C1; Daten für Promotorlänge 3420 bp nicht gezeigt). Interessanterweise war die *GUS*-

Färbung in drei Wochen alten, unter Langtagbedingungen angezogenen *PRpoTp::GUS*-Keimlingen mit dem kürzeren Promotorfragment stärker als in Keimlingen mit dem längeren Promotorfragment (Abb. 26b).

Zu Beginn wurde die Auswirkung unterschiedlicher Lichtqualitäten auf die *GUS*-Expression unter der Kontrolle der *RpoTmp*- und *RpoTp*-Promotoren untersucht. Dazu wurden die für vier (*PRpoTmp::GUS*) und sieben Tage (*PRpoTp::GUS*) unter Normallicht angezogenen Keimlinge für jeweils vier Stunden Dunkelheit, Schwachlicht ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) und Starklicht ($300 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) ausgesetzt. Für keine der *GUS*-Pflanzen konnte ein Unterschied in der *GUS*-Expression für eine der Bestrahlungsarten im Vergleich zum Kontrollversuch im Normallicht ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

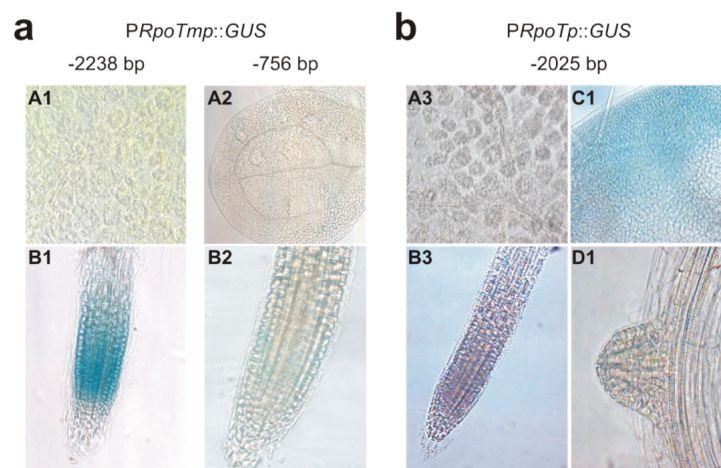


Abb. 22: β -Glukuronidase-Färbung von Keimlingen mit *PRpoT::GUS*-Fusionskonstrukten von *Arabidopsis thaliana*. Histochemische Lokalisation von *RpoTmp* (a) in vier Tage alten Keimlingen mit langem (a, links) und kurzem (a, rechts) *RpoTmp*-Promotorfragment und *RpoTp* (b) in sieben Tage alten Keimlingen mit einer *RpoTp*-Promotorlänge von 2025 bp in Kotyledonen (A1-3), Wurzelspitzen (B1-3), Primärblättern (C1) und Seitenwurzeln (D1).

Neben der Lichtqualität wurde auch die Auswirkung der Dauer der Beleuchtung auf die *GUS*-Expression untersucht. Dazu wurden die für vier Tage unter Normallicht angezogenen *PRpoTmp::GUS*-Keimlinge zunächst für 48 Stunden Dauerweißlicht ausgesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die weiter unter Langtagbedingungen gewachsen sind (Abb. 23b), zeigten die *PRpoTmp::GUS*-Keimlinge eine stärkere *GUS*-Expression in allen untersuchten Geweben (Abb. 23a). Die Stärke der *GUS*-Expression war auch hier von der *RpoTmp*-Promotorlänge abhängig, wobei *GUS*-Pflanzen mit dem kurzen Promotorfragment eine geringere *GUS*-Färbung zeigten (Abb. 23a, rechts), als Pflanzen mit dem längeren Promotorfragment (Abb. 23a, links). Eine *GUS*-Expression unter der Kontrolle des

RpoTnp-Promotors wurde im Leitgewebe der Kotyledonen unter Langtaglichtbedingungen erst ab dem Alter von sieben Tagen beobachtet (Emanuel et al., 2005). In Pflanzen, die im Alter von vier Tagen für 48 Stunden Dauerlicht ausgesetzt waren, konnten bereits nach sechs Tagen gefärbte Leitbündel beobachtet werden (Abb. 23a, A1).

Das Dauerlicht scheint die am *RpoTnp*-Promotor getriebene Transkription früher zu aktivieren, jedoch keine weitere Veränderung in den Expressionsmustern zu bewirken (Abb. 23a, B1-D1). Diese Beobachtung konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Vier Tage alte *PRpoTnp::GUS*-Keimlinge, die für 96 Stunden dem Dauerweißlicht ausgesetzt waren, zeigten keine Unterschiede in der *GUS*-Expression im Vergleich zu Kontrollpflanzen, die unter Langtagbedingungen gewachsen sind (Daten nicht gezeigt).

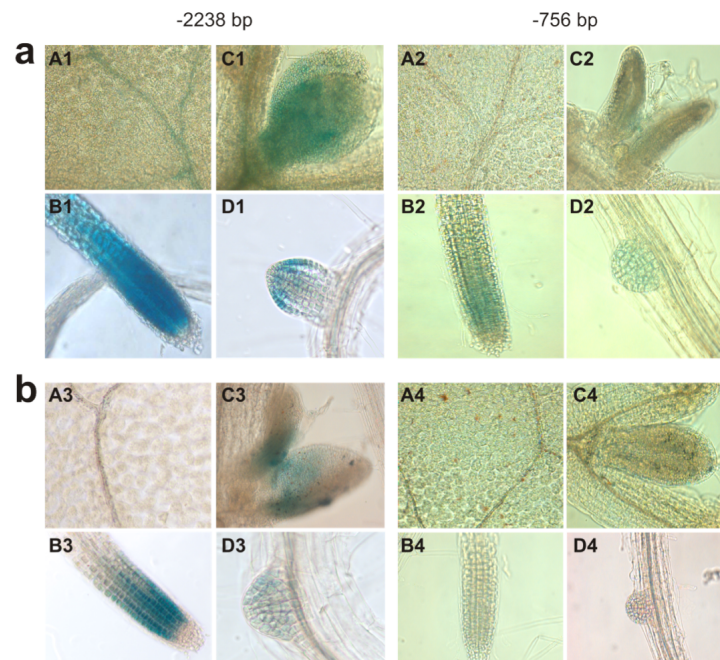


Abb. 23: Dauerlicht aktiviert zu einem früheren Zeitpunkt die Expression von *RpoTnp* in *Arabidopsis thaliana*. β -Glukuronidase-Färbung von *PRpoTnp::GUS*-Keimlingen (a) nach 48 h Dauerweißlicht. Im Kontrollversuch wurden die *GUS*-Pflanzen (b) Langtagbedingungen ausgesetzt. Histochemische Lokalisation von *RpoTnp* in Kotyledonen (A1-4), Wurzelspitzen (B1-4), Primärblättern (C1-4) und Seitenwurzeln (D1-4).

Auch die *RpoTp*-getriebene *GUS*-Aktivität wurde unter 48 und 96 Stunden Dauerweißlicht untersucht. Beide Pflanzen mit *RpoTp*-Promotorfragmenten der Längen 3420 bp und 2025 bp zeigten eine entwicklungsabhängige *GUS*-Färbung. Wie in Kontrollpflanzen, die unter Langtagbedingungen wuchsen (Abb. 24b), konnte die *GUS*-Aktivität sowohl nach 48, als auch nach 96 Stunden Dauerlicht nur im nicht-vaskulären, photosynthetisch aktiven Parenchym der Primärblätter beobachtet werden (Abb. 24a, C1;

Daten für 96 h Dauerlicht und für *PRpoTp::GUS*-Pflanzen mit Promotorfragment der Länge 3420 bp nicht gezeigt).

Um eine mögliche Regulation der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen durch Lichtinduktion zu untersuchen, wurden vier Tage alte etioliierte Keimlinge von *PRpoTnp::GUS* (Abb. 25a) für 24 Stunden Normalweißlicht ausgesetzt. In Dunkelheit aktivierte das lange Promotorfragment die *GUS*-Expression in Keimblättern (Abb. 25a, A1) und, anders als im Licht, nicht in der Wurzelspitze (Abb. 25a, B1). Eine 24-stündige Belichtung durch Weißlicht nach dem Etiolement führte zum Abklingen der Expression in den Keimblättern (Abb. 25b, A3) und zur Aktivierung der Expression in der Wurzel (Abb. 25b, B3).

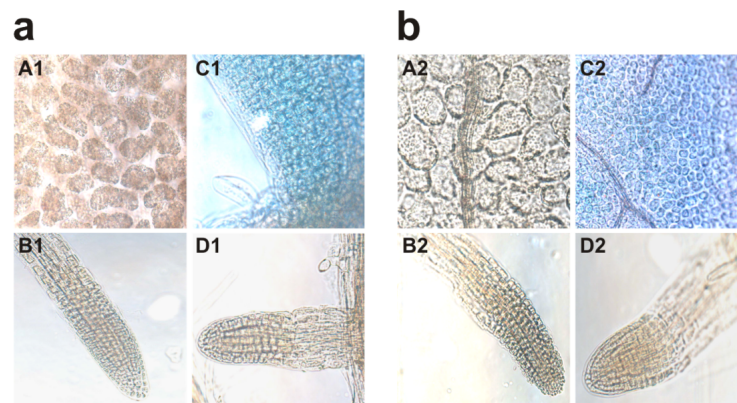


Abb. 24: Entwicklungsabhängige Expression von *RpoTp*. β -Glukuronidase-Färbung von neun Tage alten *PRpoTp::GUS*-Keimlingen mit der *RpoTp*-Promotorlänge von 2025 bp unter 48 h Dauerweißlicht (a) und Langtagbedingungen (b). Histochemische Lokalisation von *RpoTp* in Kotyledonen (A1-2), Wurzelspitzen (B1-2), Primärblättern (C1-2) und Seitenwurzeln (D1-2).

Rot-, Blau- und Dunkelrotlicht aktivieren unterschiedliche Sätze von Photorezeptoren (Ma et al., 2001). Um die Auswirkung dieser drei Lichtwellenlängen auf die Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen zu untersuchen, wurden *PRpoT::GUS*-Keimlinge aus weißem Licht für 15 Stunden in rotes, blaues und dunkelrotes Licht (jeweils $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) gebracht. Allerdings führten diese unterschiedlichen Bedingungen zu keiner Veränderung des Expressionsmusters (Daten nicht gezeigt).

Dieser Versuch wurde mit vier Tage alten, etioliierten *PRpoT::GUS*-Keimlingen wiederholt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Blau- (Abb. 25d) und Dunkelrotlicht (Abb. 25e), zum vollständigen Abklingen der *RpoTnp*-getriebenen *GUS*-Expression am langen Promotorfragment in Keimblättern (Abb. 25d, A7 und Abb. 25e, A9) und zur ihrer Aktivierung in der Wurzel führen (Abb. 25d, B7 und Abb. 25e, B9). Rotlicht (Abb. 25c)

hingegen ließ die *RpoTmp*-getriebene *GUS*-Expression am langen Promotorfragment in Keimblättern kaum abklingen (Abb. 25c, A5), aktivierte sie aber ähnlich stark in der Wurzel (Abb. 25c, B5). Diese Daten lassen daher auf ein *enhancer*-Element der Transkription im Bereich von -756 bp bis -2238 bp des *RpoTmp*-Promotorbereichs schließen. Darüber hinaus weist der lichtinduzierte Wechsel der *RpoTmp*-Expression von den Kotyledonen in Dunkelheit hin zum Wurzelgewebe im Licht in Keimlingen mit langem Promotor-*GUS*-Konstrukt auf weitere regulatorische *cis*-Elemente zur gewebsspezifischen Expression in diesem Promotorbereich hin. Am lichtinduzierten Wechsel der gewebsspezifischen Expression könnten demnach Cryptochrom- und/oder Phytochrom-Rezeptoren beteiligt sein.

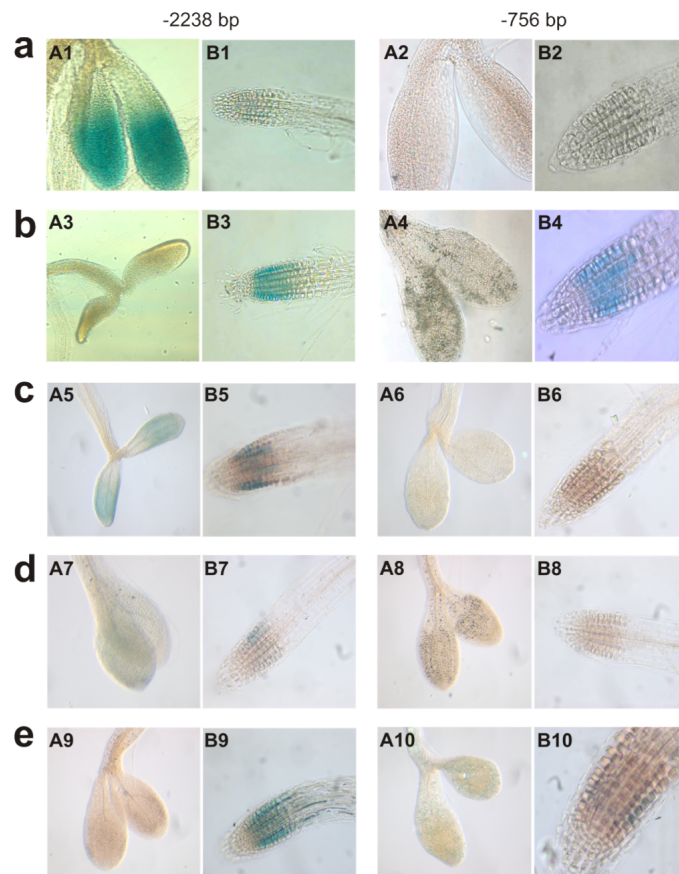


Abb. 25: Die Transkription von *RpoTmp* wird in Dunkelheit in Keimblättern am langen Promotorfragment aktiviert. Etiolierte vier Tage alte Keimlinge von *PRpoTmp::GUS* (a) mit langem (links) und kurzem (rechts) Promotorfragment von *RpoTmp* wurden für 24 Stunden Weißlicht (b) und für 15 Stunden Rot- (c), Blau- (d) und Dunkelrotlicht (e) ausgesetzt. Histochemische Lokalisation von *RpoTmp* mittels GUS-Färbung in Keimblättern (A1-10) und Wurzelspitzen (B1-10).

Obwohl die *RpoTp*-Expression durch Weißlicht in älteren Blattzellen induziert werden konnte, zeigen die *PRpoTp::GUS*-Pflanzen nach Belichtung etiolierter Keimlinge durch Weiß-, Rot-, Blau- oder Dunkelrotlicht keine nachweisbare *GUS*-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise liegt in diesem frühen Entwicklungsstadium die Stärke der lichtinduzierten *RpoTp*-Expression unter der Nachweisgrenze der Aktivität des *GUS*-Reportergens.

III.2.1.2 Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen unter Salzstress

Die Salzkonzentration gehört neben Licht, Kälte und Trockenheit zu den hochvariablen Stressfaktoren, denen eine Pflanze ausgesetzt ist. Allerdings haben Pflanzen vielfältige Möglichkeiten auf diese unterschiedlichen Faktoren zu reagieren (Kreps et al., 2002). Um die Auswirkung von Salzstress auf die Expression von *RpoTmp* und *RpoTp* zu untersuchen, wurden 21 Tage alte, auf SEA-Medium (s. Kap. II.1.1) und unter Langtagbedingungen angezogene Pflanzen mit *PRpoTmp::GUS*- und *PRpoTp::GUS*-Transgenen verwendet und für 5 Stunden auf 300 mM NaCl-haltiges Medium gebracht (Abb. 26). Die Expression von *GUS* wurde durch die hohe Salzkonzentration im Medium sowohl am *RpoTmp*- (Abb. 26a), als auch am *RpoTp*-Promotor (Abb. 26b) stimuliert. Wie schon zuvor in *PRpoTmp::GUS*-Keimlingen beobachtet (Abb. 26b), zeigte sich auch hier für das kürzere *PRpoTmp::GUS*-Konstrukt eine wesentlich geringere *GUS*-Aktivität, was auf ein *enhancer*-Element im Bereich von -756 bp bis -2238 bp schließen lässt (Abb. 26a, Panel „Kurz“). Die *cis*-Elemente, welche für die Induktion der Expression unter Salzstress verantwortlich sind, liegen demnach im Promotorbereich zwischen -1 bp und -756 bp. Die *GUS*-Expression wird in *PRpoTp::GUS*-Keimlingen mit dem kurzen Promotorfragment durch Salzstress nicht stimuliert (Abb. 26b, Panel „Kurz“). Im Gegensatz dazu wird in *PRpoTp::GUS*-Keimlingen mit dem langen Promotorfragment die unter Normalbedingungen kaum detektierbare *GUS*-Expression durch Salzstress aktiviert (Abb. 26b, Panel „Lang“). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass im Bereich von -3420 bp bis -2025 bp des *RpoTp*-Promotors regulatorische Elemente lokalisiert sein könnten.

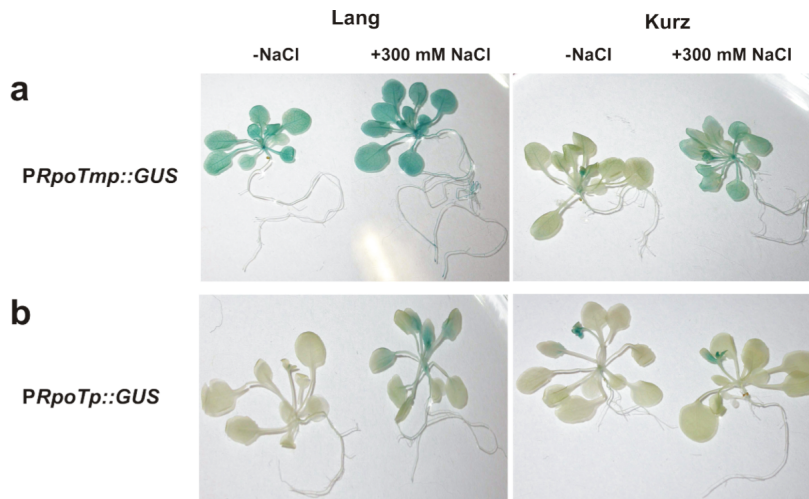


Abb. 26: Salzstress stimuliert die Transkription von *RpoTmp* und *RpoTp*. β -Glukuronidase-Färbung von 21 Tage alten *PRpoTmp::GUS*- (a) und *PRpoTp::GUS*-Pflanzen (b) mit langem (links) und kurzem (rechts) Promotorfragment nach fünf Stunden auf salzhaltigen Medium.

III.2.1.3 Wirkung von Spectinomycin auf die Expression von *RpoTp* und *RpoTmp*

Neben dem Salzstress wurde auch die Auswirkung von Spectinomycin auf die Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen untersucht. Spectinomycin hemmt die plastidäre Translation (Zubko und Day, 1998). In der Charakterisierung plastidärer Promotoren von *Arabidopsis* mittels der 5'-*RACE* Analyse (s. Kap. III.1.2.1) konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zum grünen, im weißen, auf Spectinomycin gebildeten Gewebe z. T. erhebliche Unterschiede in der Promotornutzung gibt. Da die PEP in den Plastiden der chlorophylldefizienten Pflanzen gar nicht oder nur in geringen Mengen bereitgestellt wird, werden hauptsächlich NEP-generierte Transkripte gefunden. Da diese teilweise verstärkt akkumulieren, könnte auf Spectinomycin die Expressionsaktivität der beiden Gene *RpoTmp* und *RpoTp* für die NEP-Transkriptionsaktivität ebenfalls erhöht sein. Um das zu überprüfen, wurden Keimlinge von *PRpoTmp::GUS*- und *PRpoTp::GUS*-Pflanzen für acht Tage auf spectinomycinhaltigem Medium unter Langtagbedingungen angezogen. Vergleichbar mit der Analyse der stationären Transkriptmengen der Gene *RpoTmp* und *RpoTp* (Abb. 14), war die *GUS*-Expression unter Kontrolle der *RpoTmp*- und *RpoTp*-Promotoren in spectinomycinbehandelten Pflanzen deutlich verstärkt. Promotorfragmente von *RpoTmp* aktivierten die *GUS*-Expression in den Keimblättern chlorophylldefizienter *GUS*-Pflanzen (Abb. 27a, A1 und A2). Dabei konnte die *GUS*-Färbung sowohl in den Leitbündeln, als auch im Parenchym der Keimblätter beobachtet werden. In den Wurzelspitzen wurde ebenfalls für beide *PRpoTmp::GUS*-Transgene eine

vergleichbar starke Expression detektiert (Abb. 27a, B1 und B2). Auch der *RpoTp*-Promotor hatte eine starke Aktivität in spectinomycinbehandelten Pflanzen (Abb. 27b). Eine deutliche GUS-Färbung wurde sowohl in Leitgefäßen, als auch im nicht-vaskulären Parenchym der Keimblätter beobachtet (Abb. 27b, A3). Der *RpoTp*-Promotor aktivierte jedoch nicht die Expression in der Wurzelspitze (B3).

Im Allgemeinen zeigten im Vergleich zum grünen Gewebe (vergl. Abb. 22 und Abb. 24), alle *RpoT*-Promotorkonstrukte im weißen, spectinomycinbehandelten Gewebe eine wesentlich stärkere *GUS*-Expression. Das Fehlen der PEP resultiert also in der Tat in einer erhöhten Expression der Gene für die beiden plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen.

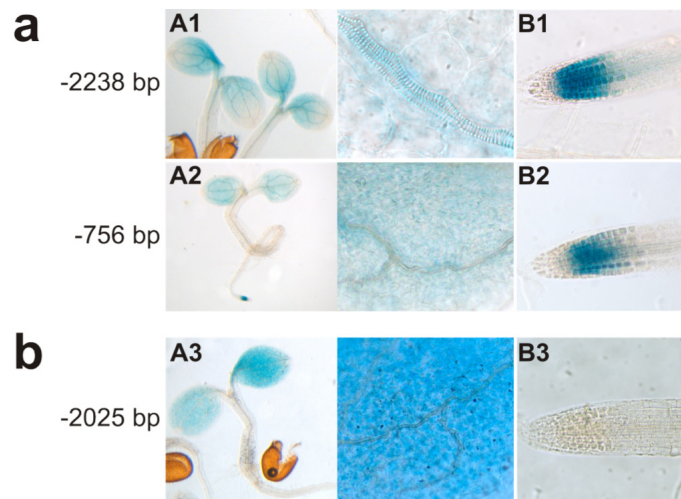


Abb. 27: Spectinomycin stimuliert die Transkription von *RpoTmp* und *RpoTp*. Histochemische Lokalisation von *RpoTmp* (a) und *RpoTp* (b) in acht Tage alten Keimlingen nach Wachstum auf spectinomycinhaltigem Medium. β -Glukuronidase-Färbung in Keimblättern (A1-3) und Wurzelspitzen (B1-3).

III.2.2 Regulation der plastidären Transkription durch Licht

Ein wichtiges Ereignis im pflanzlichen Lebenszyklus ist die Bereitstellung photosynthetischer Leistung in etioliertem Gewebe, das in Dunkelheit gebildet, einem täglichen Lichtzyklus ausgesetzt wird. Die Entwicklung eines Chloroplasten und die Transkription seines Genoms läuft koordiniert ab (Klein und Mullet, 1990). Die Kontrolle der plastidären Genexpression erfolgt auf mehreren Ebenen. So wird die Akkumulation einiger plastidenkodierter Polypeptide in Gerstebblättern co-translational und/oder posttranslational kontrolliert (Klein et al., 1988; Klein und Mullet, 1986). Auch die Mengen

der spezifischen plastidenkodierten Transkripte in der Gerste veränderten sich durch Beleuchtung, was auf eine Kontrolle der Genexpression auf der Ebene der Transkription und posttranskriptional durch RNA-Prozessierung sowie Veränderung der Transkriptstabilität hindeutet (Klein und Mullet, 1987; Mullet und Klein, 1987).

Die Analyse der *GUS*-Expression unter der Kontrolle der Promotoren von *RpoTmp* und *RpoTp* hat Unterschiede in der Genexpression der beiden kernkodierten, plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTmp* und *RpoTp* unter wechselnden äußeren Bedingungen aufgezeigt (Kap. III.2.1). Gerade der lichtinduzierte gewebsspezifische Wechsel der *RpoTmp*-Expression von etiolierten Keimblättern zur Wurzelspitze zeigt, dass Licht eine sehr wichtige Rolle bei der Bereitstellung der kernkodierten Transkriptionsaktivität in den Plastiden spielt (Kap. III.2.1.1). An dieser Stelle war es besonders interessant, die Wirkung des Lichts auf die Expression der Zielgene der plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde die Lichtinduktion der Transkription einiger ausgewählter plastidärer Gene in *Arabidopsis thaliana* analysiert. Dafür wurden oberflächensterilisierte WT-Samen für jeweils drei oder sieben Tage in Dunkelheit auf spectinomycinfreiem (Abb. 28a) und spectinomycinhaltigem (Abb. 28b) Selektionsmedium angezogen (Deng und Grissem, 1987; Svab et al., 1990; Zubko und Day, 1998). Anschließend wurden die etiolierten Keimlinge für 1, 4, 6, 12 und 24 Stunden weißem Normallicht der Intensität $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ausgesetzt. Um älteres Gewebe für die Analyse zu generieren, wurden die Samen für 19 Tage unter Langtagkonditionen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen, danach für drei Tage der Dunkelheit und anschließend wie oben beschrieben dem Normallicht unterschiedlicher Dauer ausgesetzt.

Sowohl auf spectinomycinfreiem, als auch auf spectinomycinhaltigem Medium in Dunkelheit angezogene Keimlinge (Abb. 28) zeigten die für etiolierte Pflanzen typische Morphologie mit einem starken Streckungswachstum sowie schwach ausgebildetem Festigungsgewebe der Sprosse und kleinen gelblichen Keimblättchen (Liscum und Hangarter, 1993). Nach dem Transfer ins Weißlicht ergrünten die Blättchen der Keimlinge, die ohne Spectinomycin gewachsen waren. Eine erste Grünfärbung der Keimblätter war nach ca. vier bis sechs Stunden unter Weißlicht sichtbar. Die auf spectinomycinhaltigem Medium angezogenen Keimlinge veränderten ihre Färbung nicht (Daten nicht gezeigt). Nach 19 Tagen Wachstum unter Langtagbedingungen und anschließender Verwahrung für drei Tage in Dunkelheit zeigten die Pflanzen auf

spectinomycinfreiem Medium keinen besonderen Phänotyp. Die spectinomycinbehandelten, weißen Pflanzen arretierten allerdings nach zehn Tagen im Wachstum (vergl. Abb. 7), wurden aber trotzdem für die vergleichenden Experimente ebenfalls weitere neun Tage unter Lichtbedingungen und anschließend drei Tage in Dunkelheit angezogen.

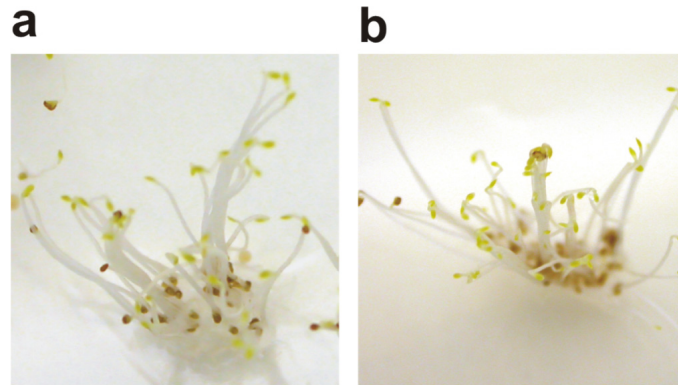


Abb. 28: Etiolierte Keimlinge von *Arabidopsis thaliana*. Sieben Tage alte spectinomycinunbehandelte (a) und spectinomycinbehandelte (b) WT-Pflanzen.

Um mögliche Unterschiede in der Lichtinduktion der Transkription durch NEP und PEP in Keimlingen zu beobachten, wurden für die *Primer Extension* Assays Gene mit verschiedenen plastidären Promotortypen untersucht. Dazu gehörten das PEP-transkribierte *psbA* Gen (Abb. 29) sowie das NEP-transkribierte *rpoB* Gen (Abb. 30). Des Weiteren wurden das *rrn16* Gen (Abb. 32), das an einem PEP- und einem Pc-Promotor transkribiert wird, sowie die Gene *ycf1* (Abb. 33) und *clpP* (Abb. 31), die sowohl PEP-, als auch NEP-transkribiert werden, untersucht.

Sowohl in drei (3T), als auch in sieben (7T) Tage alten etiolierten Keimlingen konnten die Transkript-5'-Enden des *PpsbA-77* PEP-Promotors (vergl. Abb. 8b) detektiert werden (Abb. 29a und c, Spur 1).

Der Transfer der etiolierten Keimlinge ins Weißlicht ging mit einem Anstieg der Transkriptmengen von *psbA* bereits innerhalb der ersten Stunde unter Belichtung einher (Spur 2). Doch während in drei Tage alten Keimlingen unter weiterer Lichtgabe die akkumulierten Transkriptmengen kontinuierlich anstiegen (Abb. 29a, Spuren 3 - 6), blieben sie in sieben Tage alten Keimlingen unverändert (Abb. 29c, Spuren 3 - 6). Auch in etiolierten Keimlingen der spectinomycinbehandelten Pflanzen wurden die Transkript-5'-Enden des PEP-Promotors *PpsbA-77* detektiert (Abb. 29b und d, Spur 7). Diese waren, wie schon in der Analyse der Transkriptakkumulation mittels *Microarrays* gezeigt (Abb. 15),

geringer und veränderten sich nur geringfügig nach dem Transfer der Keimlinge ins Licht (Abb. 29, Spuren 8 - 12).

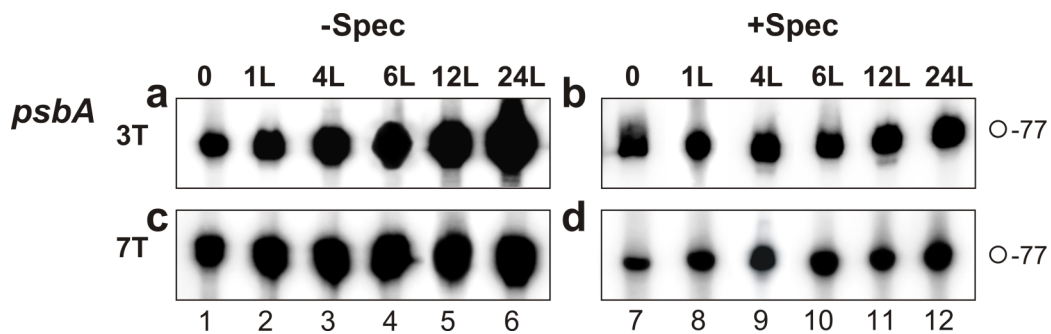


Abb. 29: Lichtinduktion der Transkription am PEP-Promotor des plastidären Gens *psbA* in etioliierten Keimlingen von *Arabidopsis thaliana*. Drei (3T, a und b) und sieben (7T, c und d) Tage alte unbehandelte (a und c) und spectinomycinbehandelte (b und d) Keimlinge wurden nach dem Etiolement (0) für jeweils 1 Stunde (1L), 4 Stunden (4L), 6 Stunden (6L), 12 Stunden (12L) und 24 Stunden (24L) ins Dauerweißlicht transferiert. Isolierte RNA wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. Der identifizierte PEP-Promotor (○) ist durch den Abstand in Nukleotiden des Transkriptionsstartpunktes von ATG angegeben.

Die Transkript-5'-Enden des Typ-Ib NEP-Promotors des *rpoB*-Operons (*PrpoB*-300, vergl. Abb. 10b) waren nur schwach detektierbar. Während die Transkriptmengen in sieben Tage alten etioliierten Keimlingen (Abb. 30c, Spur 1) auf einem geringen Niveau und ohne Veränderung durch Licht akkumulierten (Spuren 2 - 6), waren in den drei Tage alten Keimlingen keine Transkriptmengen des *PrpoB*-300 NEP-Promotors auszumachen (Abb. 30a, Spur 1). Eine durch Licht induzierte Transkriptakkumulation wurde in drei Tage alten Keimlingen erst nach vier Stunden Lichtgabe detektiert (Spuren 3 - 6). Auch unter Einfluss von Spectinomycin akkumulierten die Transkript-5'-Enden von *PrpoB*-300 in sieben Tage alten Keimlingen (Abb. 30d) höher als in drei Tage alten Keimlingen (Abb. 30b). Erstaunlicherweise gab es in drei Tage alten Keimlingen nach 24-stündiger Belichtung eine sehr starke Akkumulation der *rpoB*-Transkripte (Abb. 30b, Spur 12).

Das Gen *clpP* wird in Arabidopsis von einem schwachen PEP-Promotor (*PclpP*-115; Sriraman *et al.*, 1998a) und dem starken Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 transkribiert (vergl. Abb. 8c). Die an beiden Promotoren initiierten Transkript-5'-Enden akkumulierten in sieben Tage alten etioliierten Keimlingen (Abb. 31c, Spur 1) stärker als in drei Tage alten Keimlingen (Abb. 31a, Spur 1). Die Transkription beider Promotoren scheint nicht lichtabhängig zu sein, da nach Bestrahlung kein Anstieg der Transkriptmengen beobachtet werden konnte (Spuren 2 - 6). Die Wirkung von Spectinomycin resultierte nicht nur in einer erhöhten Transkription am NEP-Promotor *PclpP*-58, sondern auch am PEP-Promotor

PclpP-115 (Abb. 31b und d, Spuren 7 - 12). Dies wurde für keinen weiteren der untersuchten PEP-Promotoren beobachtet und könnte wiederum ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei dem Promotor *PclpP*-115 eher um einen NEP-Promotor, als, wie bisher angenommen, um einen PEP-Promotor handeln könnte (Sriraman *et al.*, 1998a, vergl. Kap. III.1.2.2).

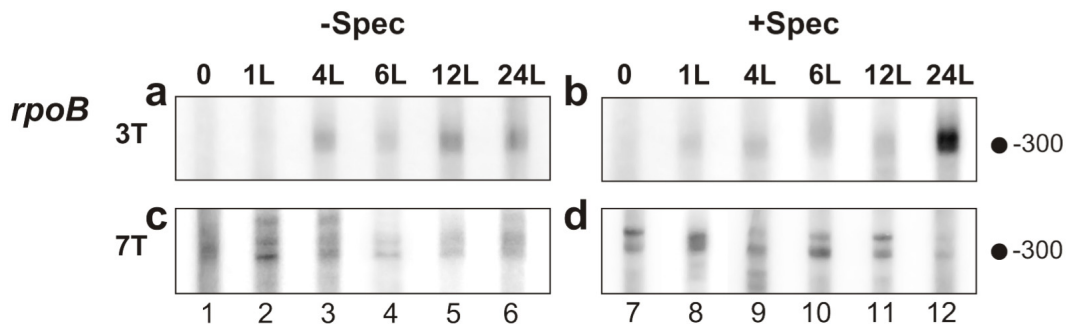


Abb. 30: Licht induziert die Transkription am NEP-Promotor *PrpoB*-300 im jungen etiolierten Gewebe. Drei (3T, a und b) und sieben (7T, c und d) Tage auf spectinomycinfreiem (a und c) und -haltigem (b und d) Medium in Dunkelheit angezogene Wildtyp-Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* (0) wurden für jeweils 1 Stunde (1L), 4 Stunden (4L), 6 Stunden (6L), 12 Stunden (12L) und 24 Stunden (24L) ins Dauerweißlicht transferiert. Isolierte RNA wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. Der identifizierte NEP-Promotor (●) ist durch den Abstand des primären 5'-Endes der RNA von ATG in Nukleotiden angegeben.

Die Transkript-5'-Enden von *rrn16* akkumulieren sowohl in drei, als auch in sieben (Abb. 32) Tage alten etiolierten Keimlingen. Die Transkript-5'-Enden vom PEP-Promotor *Prrn16*-112 (vergl. Abb. 8d) akkumulierten stärker in jüngeren (Abb. 32a), die Transkript-5'-Enden vom Pc-Promotor *Prrn16*-139 dagegen in älteren Keimlingen (Abb. 32c). Während in Plastiden aus viereinhalb Tage alten etiolierten Gerstekeimlingen der Transfer ins Licht mit einem leichten Abfall der 16S rRNA-Mengen einher geht (Mullet und Klein, 1987), gibt es einen lichtinduzierten Anstieg der Menge von 16S rRNA in Plastiden gleicher Keimlinge im Alter von acht Tagen (Klein und Mullet, 1990). In jüngeren *Arabidopsis*-Keimlingen war die Akkumulation der PEP-generierten Transkripte unter Belichtung konstant (Abb. 32a, Spuren 2 - 6), in älteren Keimlingen hingegen stiegen die Transkriptmengen nach einer Stunde Licht an (Abb. 32c, Spur 2) und blieben danach konstant (Spuren 3 - 6). Die am Pc-Promotor *Prrn16*-139 initiierten Transkript-5'-Enden akkumulierten während der Belichtung unverändert (Abb. 32a und c, Spuren 2 - 6). In drei Tage alten spectinomycinbehandelten Keimlingen konnte allerdings eine leichte Induktion der Transkription von *rrn16* bis 12 Stunden Lichtgabe beobachtet werden, welche dann nach 24 Stunden wieder abnahm (Abb. 32b, Spuren 7 - 12). Ein ähnliches, allerdings weitaus

schwächeres Muster zeigte sich auch bei der Analyse der Transkriptakkumulation von *Prrn16-139* in sieben Tage alten Keimlinge nach Belichtung (Abb. 32d, Spuren 7 - 12).

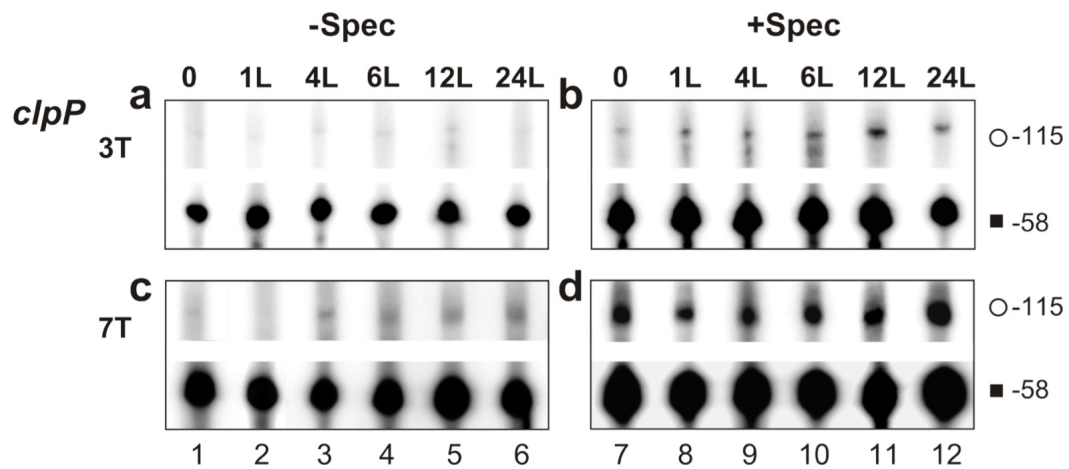


Abb. 31: Untersuchung der Wirkung von Licht auf die Transkription des plastidären Gens *clpP* im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*. Drei (3T, a und b) und sieben (7T, c und d) Tage alte Keimlinge wurden ohne (a und c) und mit Spectinomycin (b und d) angezogen und nach dem Etiolement (0) für jeweils 1 Stunde (1L), 4 Stunden (4L), 6 Stunden (6L), 12 Stunden (12L) und 24 Stunden (24L) ins Dauerweißlicht transferiert. Isolierte RNA wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. PEP- (○) und Typ-II NEP- (■) Promotoren (Sriraman et al., 1998) sind durch den jeweiligen Abstand der Transkriptionsstartpunkte von ATG in Nukleotiden angegeben.

Im Vergleich zum unbehandelten Gewebe akkumulierten im spectinomycinbehandelten Gewebe die PEP-generierten Transkripte von *PpsbA-77* (Abb. 29b und d) geringer als die von *Prrn16-112* (Abb. 32b und d). Im Gegensatz dazu akkumulierten die Transkript-5'-Enden des PEP-Promotors *PclpP-115* (Abb. 31b und d), ähnlich wie die des Pc-Promotors *Prrn16-139* (Abb. 32b und d), stärker nach der Behandlung durch Spectinomycin.

Die Transkript-5'-Enden des Typ-I NEP-Promotors *PycfI-104* (vergl. Abb. 9c) konnten weder in drei, noch sieben Tage alten etiolierten Keimlingen detektiert werden (Abb. 33a und c, Spur 1). Der Transfer der Keimlinge ins Licht führte zu einer Induktion der Transkription an diesem Promotor, wobei die Transkriptmengen in sieben Tage alten Keimlingen auf einem höheren Niveau akkumulierten (Abb. 33c, Spuren 2 - 6), als in drei Tage alten Keimlingen (Abb. 33a, Spuren 2 - 6). Die Transkripte des Promotors *PycfI-104* konnten in keinen der etiolierten spectinomycinbehandelten Keimlinge beobachtet werden (Abb. 33b und d, Spur 7). Jedoch war auch hier eine Induktion der Transkription durch Licht sichtbar. Während in drei Tage alten spectinomycinbehandelten Keimlingen die Transkript-5'-Enden erst nach 12 Stunden Belichtung detektierbar waren (Abb. 33b, Spuren 11 und 12), akkumulierten sie in sieben Tage alten Keimlingen bereits nach einer Stunde

Licht auf einem hohen Niveau (Abb. 33d, Spur 8) und nahmen bei weiterer Belichtung wieder ab (Spuren 9 - 12).

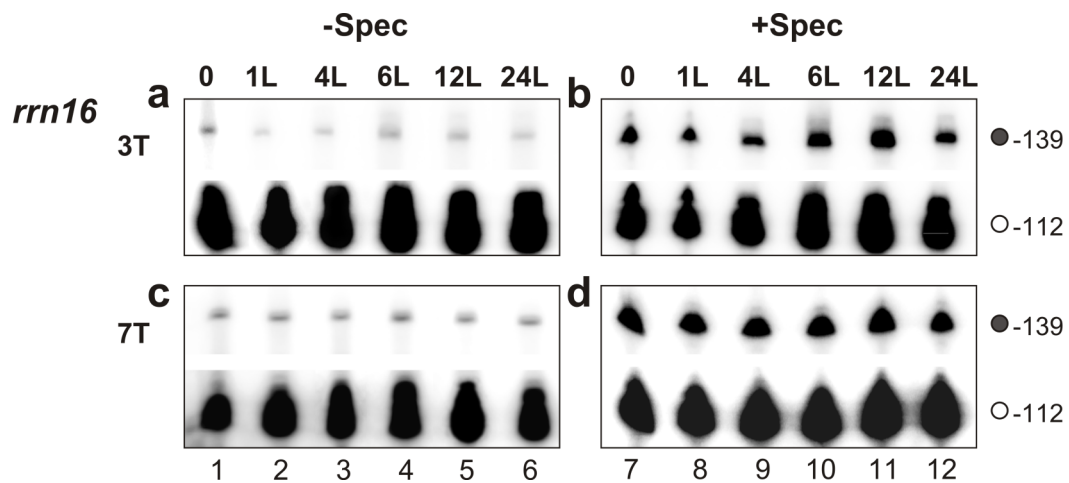


Abb. 32: Untersuchung der Wirkung von Licht auf die Transkription des plastidären Gens *rrn16* im Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*. Drei (3T, **a** und **b**) und sieben (7T, **c** und **d**) Tage alte etioliierte Keimlinge wurden ohne (**a** und **c**) und auf Spectinomycin (**b** und **d**) angezogen und nach dem Etiolement (0) für jeweils 1 Stunde (1L), 4 Stunden (4L), 6 Stunden (6L), 12 Stunden (12L) und 24 Stunden (24L) ins Dauerweißlicht transferiert. Isolierte RNA wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. Identifizierte Pc- (●) und PEP- (○) Promotoren sind durch den Abstand der Transkriptionsstartpunkte von ATG in Nukleotiden angegeben.

Der Typ-I NEP-Promotor *Pycf1-39* (vergl. Abb. 9c) zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie *PrpoB-300* (Abb. 30a und c). Die Transkript-5'-Enden von *Pycf1-39* waren in drei Tage alten etioliierten Keimlingen nicht detektierbar (Abb. 33a, Spur 1). Sie akkumulierten erst nach 12- bis 24-stündiger Belichtung (Spuren 5 und 6). Im Gegensatz dazu konnten die Transkript-5'-Enden von *Pycf1-39* nach sieben Tagen Etiolement beobachtet werden (Abb. 33c, Spur 1) und stiegen innerhalb der ersten Stunde unter Licht an (Spur 2). Die weitere Belichtung ging mit einem Abfall in der Transkriptakkumulation einher (Spuren 3 - 6). In drei Tage alten etioliierten spectinomycinbehandelten Keimlingen akkumulierten die Transkript-5'-Enden von *Pycf1-39* auf einem geringen Niveau (Abb. 33b, Spur 7). Nach einer 12- bis 24-stündigen Belichtung akkumulierten die Transkripte von *Pycf1-39* deutlich stärker (Spuren 11 und 12). In älteren Keimlingen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Nach sieben Tagen Etiolement akkumulierten die Transkript-5'-Enden von *Pycf1-39* bereits auf einem hohen Niveau (Abb. 33d, Spur 7). Die Belichtung der Pflanzen führte zu keiner weiteren Veränderung der Transkriptmenge (Spuren 8 - 12).

Für den PEP-Promotor *Pycf1-34* (vergl. Abb. 9c) konnte ein ähnliches Expressionsmuster wie für *PpsbA-77* (Abb. 29a und c) beobachtet werden. In drei Tage alten etioliierten

Keimlingen stieg die akkumulierte Menge der Transkript-5'-Enden von *Pycf1*-34 kontinuierlich an (Abb. 33a), während in sieben Tage alten etiolierten Keimlingen der Transfer ins Licht zunächst zu einem leichten Anstieg der akkumulierten Transkriptmenge nach einer Stunde (Abb. 33c, Spur 2) und eine folgende Belichtung zu keiner weiteren Veränderung der Transkriptmengen führte (Spuren 3 - 6). Im Allgemeinen akkumulierten die Transkripte von *Pycf1*-34 in sieben Tage alten Keimlingen (Abb. 33c) auf einem geringeren Niveau als in drei Tage alten Keimlingen (Abb. 33a). In spectinomycinbehandelten Keimlingen konnten die Transkripte von *Pycf1*-34, wie bei einem PEP-Promotor erwartet, kaum detektiert werden (Abb. 33b und d).

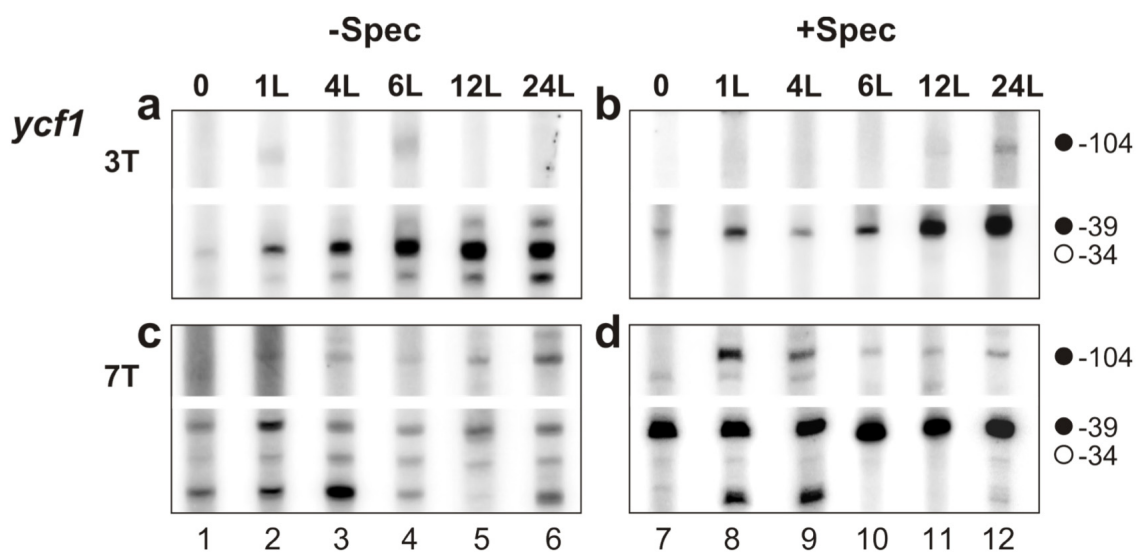


Abb. 33: Charakterisierung der Transkription von *ycf1* im Licht nach Etiolement. Drei (3T, a und b) und sieben (7T, c und d) Tage alte auf spectinomycinfreiem (a und c) und -haltigem (b und d) Medium in Dunkelheit angezogene Wildtyp-Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* (0) wurden für jeweils 1 Stunde (1L), 4 Stunden (4L), 6 Stunden (6L), 12 Stunden (12L) und 24 Stunden (24L) ins Dauerweißlicht transferiert. Isolierte RNA wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. Identifizierte NEP- (●) und PEP- (○) Promotoren sind durch den jeweiligen Abstand des Transkriptionsstartpunktes von ATG in Nukleotiden angegeben.

Der Transfer von 19 Tage alten, unter Langtagbedingungen angezogenen, Keimlingen in Dunkelheit und anschließend ins Weißlicht unterschiedlicher Dauer führt nicht zu einem veränderten Niveau der Transkript-5'-Enden der untersuchten Promotoren (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Transkription an zwei der untersuchten Typ-Ia NEP-Promotoren in sehr jungem, etioliertem Gewebe von *Arabidopsis* durch Licht induziert wird (*PrpoB*-300, Abb. 30a und *Pycf1*-39, Abb. 33a). In älteren etiolierten Keimlingen akkumulieren die Transkripte dieser beiden Promotoren bereits auf einem

höheren Niveau als in jungen, etiolierten Keimlingen (Abb. 30c und Abb. 33c). Die Lichtgabe führt in diesem Fall nicht zum Anstieg der Transkriptmengen von *PrpoB*-300 und *Pycf1*-39. Im Gegensatz dazu wird die Transkription vom Typ-I NEP-Promotor *Pycf1*-104 sowohl in jungen (Abb. 33a), als auch in älteren etioliertem Keimlingen durch Licht induziert (Abb. 33c). Ein anderes Bild zeigen der Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 (Abb. 31a und c) und der Pc-Promotor *Prrn16*-139 (Abb. 32a und c). Die an ihnen initiierten Transkripte werden durch Licht nicht in ihrer Menge beeinflusst.

Die Analyse der Lichtinduktion der Transkription plastidärer Gene wurde mit Gesamt-RNA aus Keimlingen durchgeführt. Um eine mögliche Korrelation bei der Wirkung von Licht bei der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp (vergl. Kap. III.2.1.1) und ihrer Zielgene zu ermitteln, sollte diese Analyse mit einzelnen RNA-Präparationen aus etiolierten Keimblättern sowie Wurzelspitzen wiederholt werden.

III.2.3 Die Rollen der RpoTp und RpoTmp in der plastidären Transkription

Die Funktion der RpoTp in der Transkription plastidärer Gene ist noch nicht vollständig geklärt. Für Arabidopsis SCABRA Mutanten mit fehlender Aktivität der RpoTp konnten veränderte stationäre Transkriptmengen der NEP-transkribierten Gene *rpoB*, *clpP* und *accD* gezeigt werden (Hricová et al., 2006). *Knockout*-Mutanten von *RpoTmp* zeigen eine Verzögerung im Ergrünen der Keimlinge und haben einen Defekt in der lichtinduzierten Akkumulation einiger plastidärer mRNAs (Baba et al., 2004). Während in diesen Mutanten NEP-Transkripte in geringeren Mengen als im WT vorlagen, waren PEP-Transkripte mit denen des WT vergleichbar.

Um die individuelle Rolle der RpoTp in der Entwicklung der Pflanze zu untersuchen, wurden neben den SCABRA Mutanten auch Arabidopsis-Pflanzen, die *RpoTp* überexprimieren, mittels *Northern Blot* Analyse und *Primer Extension* Analyse untersucht. Während die *RpoT*-überexprimierenden Arabidopsis-Pflanzen durch Herrn Dr. B. Hedtke (HU Berlin) bereit gestellt wurden, wurden die Mutanten *sca3-2* und *sca3-3* durch Herrn Dr. José Luis Micol (Universidad Miguel Hernández, Spanien) zur Verfügung gestellt.

Der Einbau der T-DNA in das Pflanzengenom erfolgt zufällig, wodurch in Abhängigkeit von der Anzahl der eingebauten Transgene Unterschiede in der Expression der Konstrukte auftreten. Während *RpoTp*-überexprimierende Pflanzen mit einer Kopie des *RpoTp*-Transgens im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 34a, Tp1x) keine phänotypischen Unterschiede zeigten, bildeten die Samen der Pflanzen mit fünf Transgenkopien von *RpoTp* (Tp5x) weiße

Keimlinge, die nach zwei Wochen Wachstum ergrünen (Abb. 34b, Tp5x). Interessanterweise konnte ein solcher Phänotyp weder in *AthRpoTp*- noch in *NsRpoTp*-überexprimierenden Tabakpflanzen beobachtet werden (Liere et al., 2004).

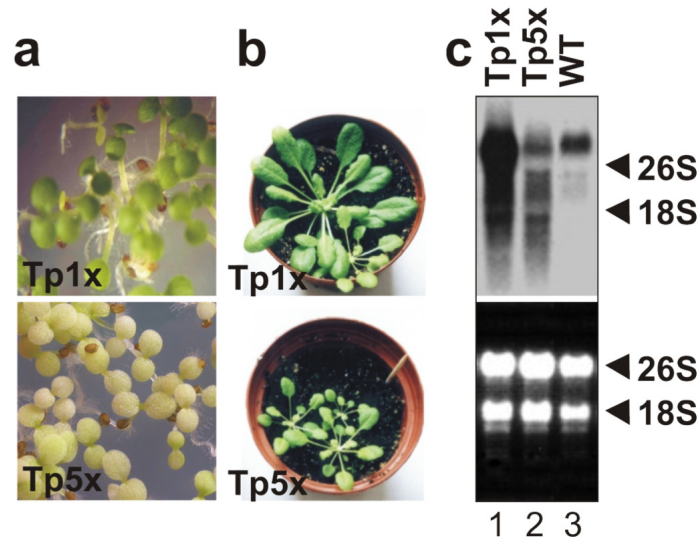


Abb. 34: Überexpression und partielle Repression des nativen Gens *RpoTp* durch die Insertion des ektopischen Gens *RpoTp* führt zu unterschiedlichen Phänotypen. Während Pflanzen mit einer Kopie des Transgens (Tp1x) nicht vom Wildtyp zu unterscheiden sind, bilden die Pflanzen mit mehreren Kopien des Transgens (Tp5x) weiße Keimlinge (a), die nach zwei Wochen ergrünen und mit dem Wildtyp vergleichbar sind (b). In der *Northern Blot* Analyse (c) wurden 50 µg Gesamt-RNA von Tp1x (Spur 1), Tp5x (Spur 2) und Wildtyp (Spur 3) im 1 %igen Agaroseformaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der RNA-Blot wurde mit einer einzelsträngigen *RpoTp*-Antisense-DNA-Sonde hybridisiert. Ethidiumbromid gefärbtes Gel zur Ladungskontrolle (unten). Die Positionen der rRNAs sind am Rand markiert. Die Hybridisierungsmuster zeigen, dass die *RpoTp*-mRNA in höchsten Mengen in überexprimierenden Pflanzen mit einem *RpoTp* Transgen (Tp1x, Spur 1) akkumuliert. In Pflanzen mit mehreren Kopien des Transgens (Tp5x, Spur 2) sind die Transkriptmengen reduziert auf die Höhe des Wildtyps (WT, Spur 3).

Die *Northern Blot* Analyse der *RpoTp*-Transkriptmengen in den *RpoTp*-überexprimierenden Pflanzen zeigte, dass die unterschiedliche Kopienanzahl des Transgens nicht nur Auswirkungen auf den Phänotyp der Keimlinge hat, sondern auch in der unterschiedlichen Transkriptakkumulation des Transgens resultiert (Abb. 34c). Während in Tp1x die *RpoTp*-mRNA in viel größeren Mengen als im Wildtyp akkumulierte (Abb. 34c, Spuren 1 und 3), wurden in Tp5x geringere Mengen des *RpoTp*-Transkripts im Vergleich zum Wildtyp beobachtet (Spur 2). Sowohl Tp1x, als auch Tp5x *RpoTp*-Transkripte zeigten niedermolekulare Degradationsprodukte, die darauf hinweisen, dass die transgene mRNA einem schnellen Umsatz ausgesetzt ist und weniger stabil als das Wildtyp *RpoTp*-Transkript.

Um die verzögerte Entwicklung der Keimlinge von Tp5x zu untersuchen, wurde mit Gesamt-RNA aus sechs Tage alten Keimlingen und drei Wochen alten Blättern eine *Northern Blot* Analyse durchgeführt. Für diese Analyse wurde das PEP-transkribierte Gen *psbA* (Abb. 35a) sowie das Gen *atpB* (Abb. 35b), das sowohl von der NEP, als auch von der PEP transkribiert wird (Abb. 8a und Abb. 9a), ausgewählt. In weißen Keimlingen der Tp5x-Pflanzen konnten kaum detektierbare Mengen der *psbA*-mRNA (Abb. 35a, Spur 3) und reduzierte Transkriptmengen von *atpB* (Abb. 35b, Spur 3) beobachtet werden, die jedoch in älteren Blättern auf das Niveau des Wildtyps zurückkehrten (Spuren 4).

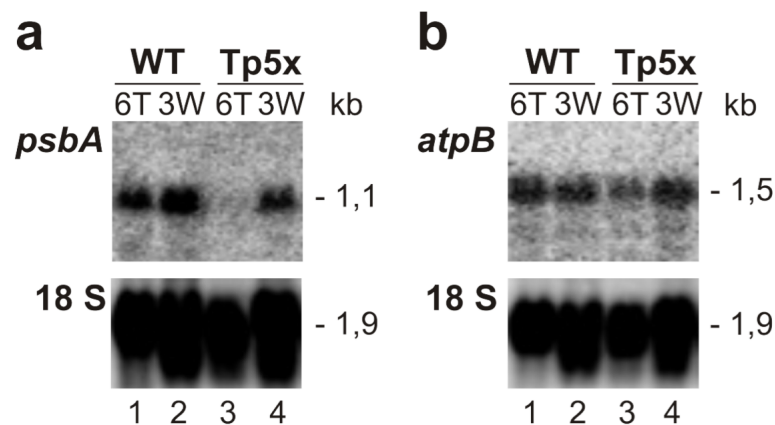


Abb. 35: Northern Blot Analyse der Transkriptmengen von *psbA* (a) und *atpB* (b) im Wildtyp und in partiell reprimierten Tp5x-Pflanzen. Fünf Mikrogramm der Gesamt-RNA aus sechs Tage (6T) alten Keimlingen des Wildtyps (Spuren 1) und der Tp5x (Spuren 3) und drei Wochen (3W) alten Blättern des Wildtyps (Spuren 2) und der Tp5x-Pflanzen (Spuren 4) wurden im 1 %igen Agaroseformaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der RNA-Blot wurde mit der entsprechenden Sequenz des angegebenen plastidären Gens hybridisiert (oben). Der gleiche Blot wurde zur Ladungskontrolle mit einer 18S-rRNA-Sonde hybridisiert (18S, unten). Die Transkriptgrößen (kb) sind am Rand angegeben.

Um den Effekt der reduzierten Expression von *RpoTp* auf die Aktivität der NEP- und PEP-Promotoren in Tp5x-Pflanzen detaillierter zu untersuchen, wurden die Transkriptmengen mittels *Primer Extension* Analyse bestimmt. Hierbei wurden die Transkript-5'-Enden ausgesuchter plastidärer Gene in vier und neun Tage alten Keimlingen, sowie in sechs Wochen alten Blättern transgener und Wildtyp-Pflanzen miteinander verglichen (Abb. 36).

Vergleichbar mit den Daten aus der *Northern Blot* Analyse akkumulierten die Transkript-5'-Enden des *PpsbA-77* PEP-Promotors (vergl. Abb. 8b) nur zu 10-30 % des Wildtyp-Niveaus in vier und neun Tage alten Keimlingen von Tp5x-Pflanzen (Abb. 36a, Spuren 8 und 9; siehe auch Abb. 38b, Spur 6). Auch die Transkript-5'-Enden des Typ-I NEP-

Promotors des *rpoB*-Operons (*PrpoB*-300, vergl. Abb. 10b) waren in Tp5x-Keimlingen nur schwach detektierbar (Abb. 36b, Spuren 8 und 9; siehe auch Abb. 38a, Spur 6). Das Gen *clpP* wird von einem schwachen PEP-Promotor (*PclpP*-115) und dem starken Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 transkribiert (vergl. Abb. 8c). Für *PclpP*-115 wurde ein ähnliches Expressionsmuster wie für *PpsbA*-77 und *PrpoB*-300 beobachtet (s. auch Abb. 38d, Spur 6). Im Gegensatz dazu zeigte die Charakterisierung von *PclpP*-58 keine signifikanten Unterschiede in der Akkumulation der Transkript-5'-Enden in Tp5x im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 36c, Spuren 8 und 9; s. auch Abb. 38d, Spur 6). Die reduzierte Expression von *RpoTp* in Tp5x-Pflanzen scheint die Transkription von Typ-I NEP-Promotoren, jedoch nicht von Typ-II NEP-Promotoren zu beeinflussen.

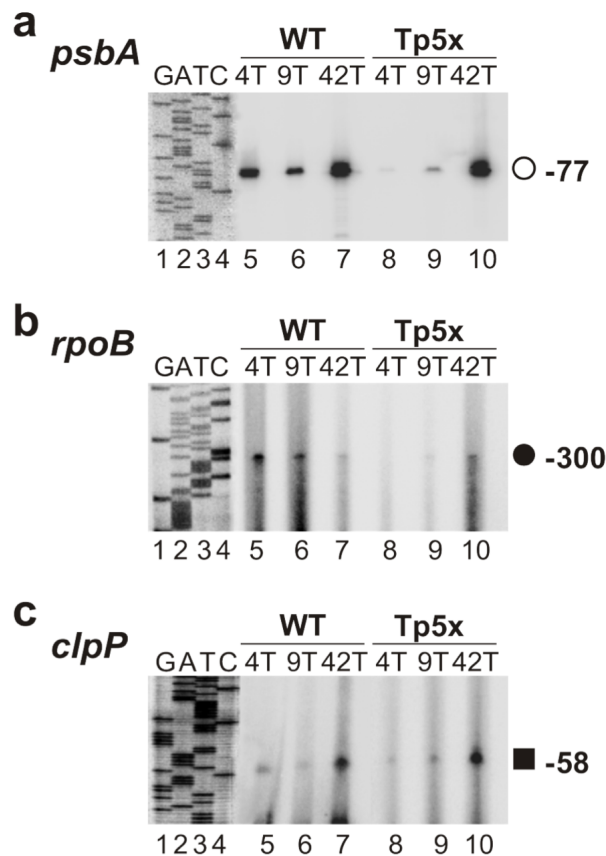


Abb. 36: Partielle Repression von *RpoTp* in Tp5x-Pflanzen beeinflusst negativ die Transkription am Typ-I *rpoB* NEP-Promotor. Geringe *rpoB*-Transkriptmengen führen zu weißen Keimlingen durch die verzögerte Synthese der PEP. Der Typ-II *PclpP*-58 NEP-Promotor ist davon nicht betroffen. *Primer Extension* Analyse ist gezeigt für die Gene *psbA* (a), *rpoB* (b) und *clpP* (c). Detektierte Typ-I NEP- (●), Typ-II NEP- (■) und PEP- (○) Promotoren sind durch den Abstand in Nukleotiden zwischen den Transkriptionsstartpunkten und dem Startcodon der Translation beschrieben. Als Referenz wurde jeweils der gleiche endmarkierte Primer für die Sequenzleiter eingesetzt. T Tage.

Um die vermutete Rolle der RpoTp in der Transkription des Plastoms zu bestätigen, wurden die durch die PEP und NEP initiierten Transkript-5'-Enden im Wildtyp und *rpoTp* Mutanten verglichen. Die *rpoTp* Mutanten *sca3-2* und *sca3-3* bildeten, wie von Hricová *et al.* (2006) beschrieben, hellgrüne Keimlinge und Blätter (Abb. 37). Im Vergleich zum Wildtyp waren beide Mutanten in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung verzögert. Vier Tage alte Kotyledonen waren vergleichbar weit entwickelt wie zwei Tage alte Wildtyp-Keimlinge. Diese Entwicklungsstadien wurden ausgesucht, um die Akkumulation der Transkript-5'-Enden ausgewählter plastidärer Gene zu untersuchen. Zu diesen Genen gehörten *psbA*, *rpoB*, *atpB*, *ycf1*, *clpP* und *rrn16*. Um den Effekt der Reduktion der RpoTp mit ihrem vollständigen Fehlen zu vergleichen, wurden zusätzlich die gleichen Transkript-5'-Enden in vier Tage alten Tp1x- und Tp5x-Pflanzen untersucht (Abb. 38 und Abb. 39).

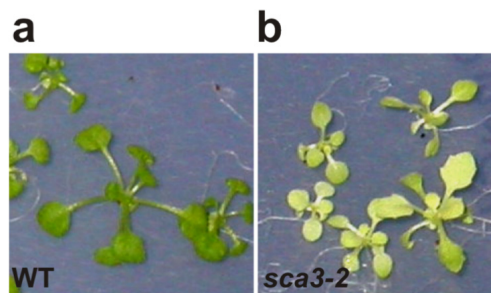


Abb. 37: Die *rpoTp* Mutante *sca3-2* bildet hellgrüne Keimlinge und Blätter. 21 Tage alten Rosetten von Wildtyp- (a) und *sca3-2*- (b) Pflanzen.

Anders als die Tp5x-Pflanzen, zeigten die *rpoTp* Mutanten generell keine Reduktion, dafür aber eine verstärkte Akkumulation von PEP initiierten Transkript-5'-Enden von *PpsbA*-77, *PatpB*-520 (Abb. 38b und c, Spuren 2 und 3), *Prrn16*-112 und *Pycf1*-34 (Abb. 39a und c, Spuren 2 und 3).

Interessanterweise konnte das in geringen Mengen vorliegende Transkript von *PclpP*-115 PEP-Promotor in vier Tage alten *rpoTp* Mutanten nicht beobachtet werden (Abb. 38d, Spuren 2 und 3). Jedoch war es zum späteren Zeitpunkt der pflanzlichen Entwicklung, in drei Wochen alten Blättern detektierbar (Spur 4). Ein vergleichbares Expressionsmuster konnte auch für die untersuchten Typ-I NEP-Transkripte beobachtet werden. Ähnlich zu Tp5x zeigten die an dem *PrpoB*-300 (Abb. 38a) und dem schwachen *Pycf1*-104 (Abb. 39c) Typ-I NEP-Promotor initiierten Transkripte reduzierte Mengen in vier Tage alten Keimlingen der *rpoTp* Mutanten (Spuren 1 - 3) im Vergleich zum zwei Tage alten Wildtyp.

In drei Wochen alten Blättern der *rpoTp* Mutanten erreichten diese jedoch fast das Niveau des Wildtyps (Spuren 1 und 4).

Für *PatpB*-318 (Abb. 38c) und *Pycf1*-39 (Abb. 39c) konnten mittels *Primer Extension* Analyse keine erwarteten Transkript-5'-Enden in vier Tage alten *rpoTp* Keimlingen detektiert werden (Spuren 2 und 3), während in drei Wochen alten Blättern von *rpoTp* die Transkriptmengen vergleichbar mit denen des Wildtyps waren (Spuren 1 und 4).

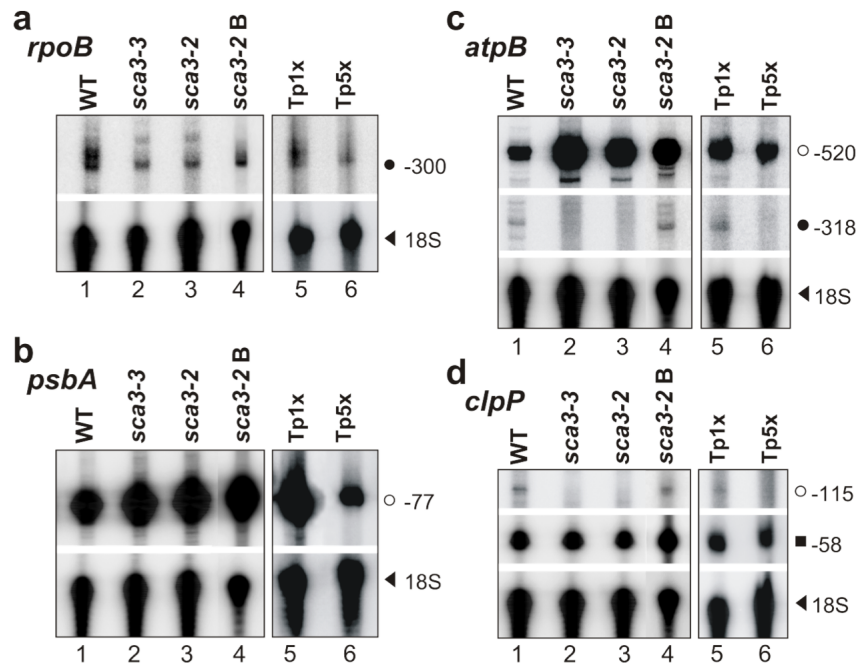


Abb. 38: Charakterisierung der Transkriptionsstartpunkte von *rpoB* (a), *psbA* (b), *atpB* (c) und *clpP* (d) in Keimlingen vom Wildtyp und von *rpoTp*. Gesamt-RNA aus zwei Tage altem Wildtyp (Spuren 1), vier Tage alten *RpoTp* T-DNA Insertionslinien *sca3-3* (Spuren 2) und *sca3-2* (Spuren 3), drei Wochen alten Blättern (B) von *sca3-2* (Spuren 4) und vier Tage alten *RpoTp*-überexprimierenden Keimlingen mit einer (Tp1x, Spuren 5) und mehreren (Tp5x, Spuren 6) Kopien des *RpoTp*-Transgens wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht. Die untere Abbildung zeigt Produkte, die zur Ladungskontrolle mit einem weiteren Primer für cytoplasmatische 18S ribosomale RNA in der gleichen *Primer Extension* Reaktion wie oben generiert wurden (18S). Detektierte Typ-I NEP- (●), Typ-II NEP- (■) und PEP- (○) Promotoren sind durch den Abstand in Nukleotiden zwischen den Transkriptionsstartpunkten und dem Startcodon der Translation beschrieben.

Die Analyse der NEP-Promotoren *PclpP*-58 (Abb. 38d) und *Prrn16*-139 (Abb. 39a) zeigte ein weitaus anderes Bild. Die an diesen beiden Promotoren initiierten Transkript-5'-Enden waren in den *rpoTp* Mutanten nicht reduziert (Spuren 2 und 3). Während sich die Akkumulation der Transkripte von *PclpP*-58 nicht verändert hat (Abb. 38d, Spuren 2 und 3), akkumulierten die am *Prrn16*-139 initiierten RNA-5'-Enden auf einem höheren Niveau in den vier Tage alten Keimlingen von *sca3-3* und *sca3-2* (Abb. 39a, Spuren 2 und

3) als in zwei Tage alten Keimlingen des Wildtyps (Spuren 1). Ein ähnliches Expressionsmuster, jedoch mit einer geringeren Ausprägung, konnte in Tp5x beobachtet werden (Spuren 6).

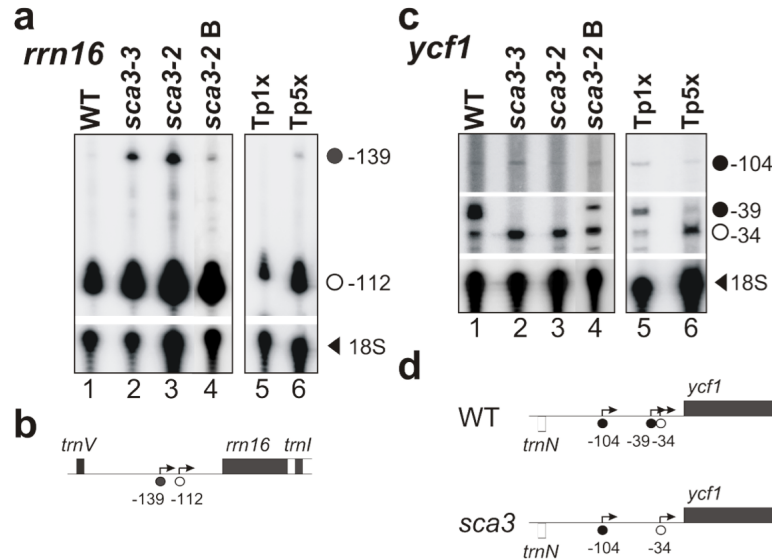


Abb. 39: Charakterisierung der Transkriptionsstartpunkte von *rrn16* (a und b) und *ycf1* (c und d) in Keimlingen vom Wildtyp und von *rpoTp*. Gesamt-RNA aus zwei Tage altem Wildtyp (Spuren 1), vier Tage alten *RpoTp* T-DNA Insertionslinien *sca3-3* (Spuren 2) und *sca3-2* (Spuren 3), drei Wochen alten Blättern (B) von *sca3-2* (Spuren 4) und vier Tage alten *RpoTp*-überexprimierenden Keimlingen mit einer (Tp1x, Spuren 5) und mehreren (Tp5x, Spuren 6) Kopien des *RpoTp*-Transgens wurde mittels *Primer Extension* Analyse untersucht (a und c). Zur Ladungskontrolle wurde in der gleichen *Primer Extension* Reaktion wie oben ein weiterer Primer für cytoplasmatische 18S ribosomale RNA eingesetzt. Die generierten Produkte sind unten abgebildet (18S). Physikalische Karte der Region von *rrn16* (b) und *ycf1* (d) zeigt die Promotornutzung im Wildtyp (oben) und in *sca3* Mutanten (unten). Detektierte Typ-I NEP- (●), Pc- (●) und PEP- (○) Promotoren sind durch den Abstand in Nukleotiden zwischen den Transkriptionsstartpunkten und dem Startcodon der Translation markiert.

Diese Daten sind ein Hinweis darauf, dass eine zusätzliche RNA-Polymerase in der Lage ist, den Verlust der Aktivität der *RpoTp* durch die Erkennung und Initiation an Typ-I NEP-Promotoren zu kompensieren. *RpoTnp* ist die einzige bekannte zweite Phagentyp-RNA-Polymerase in Plastiden und der beste Kandidat um die beobachtete Transkriptionsinitiation zu bewerkstelligen, wie es bereits durch Hricová *et al.* (2006) angeregt wurde. Dass die Transkription von sog. *non-consensus* Promotoren in den *rpoTp* Mutanten nicht negativ, sondern positiv betroffen war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass *RpoTnp* für ihre Transkription in Wildtyp-Pflanzen verantwortlich ist.

Die 5'-RACE Analyse ist eine Methode, die es möglich macht, die in der *Primer Extension* Analyse charakterisierten Transkripte noch sensitiver zu untersuchen (vergl. Kap.

III.2.1.1). Dies war von besonderer Bedeutung für die Promotoren *PatpB*-318 und *Pycf1*-39, da die an ihnen initiierten Transkripte in vier Tage alten *rpoTp* Mutanten mittels *Primer Extension* Analyse nicht detektiert werden konnten. Allerdings konnten auch in der *5'-RACE* Analyse diese Transkripte nicht detektiert werden. Zusätzlich wurden keine weiteren, bisher unentdeckten Transkriptionsstartpunkte für die untersuchten Gene gefunden. Die Ergebnisse der *5'-RACE* Analyse der zwei Tage alten Wildtyp- und vier Tage alten *sca3*-Keimlinge sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: In der *Primer Extension* Analyse detektierten Transkripte wurden mittels *5'-RACE* Analyse bestätigt.^a

Gen	Promotor	Sequenz	Anzahl der Klone	
			+T ^{WT}	+T ^{sca3}
<i>psbA</i>	<i>PpsbA</i> -77	ATGTT TACT GTTTCAT AACA AGCTC	8/8	8/8
<i>atpB</i>	<i>PatpB</i> -520	TATTT TAATAT TAAATT AAAA AT ATTA	8/8	6/7
<i>rrn16</i>	<i>Prrn16</i> -112	GCT TATATTT CTGGGAGC GAACT CCAT	7/8	8/8
<i>ycf1</i>	<i>Pycf1</i> -34	CATCAT TATAATA TCCAG AAATT GAA	7/8	13/16
<i>rpoB</i>	<i>PrpoB</i> -300	TATGTAATAT CATAGGT GAAA ATGAA	6/7	4/8
<i>ycf1</i>	<i>Pycf1</i> -104	GTGTCATTGAC CATAAGAG ATGTCGTT	7/8	5/8
<i>atpB</i>	<i>PatpB</i> -318	AATAATGAAT CATAACT AAAGTT CCG	6/8	n.d.
<i>ycf1</i>	<i>Pycf1</i> -39	CAAAATCAT CATATAATA AATCC AGAA	10/16	n.d.
<i>clpP</i>	<i>PclpP</i> -58	AAAAAACGAAACCC CAATTTTACGTT	8/8	7/7
<i>rrn16</i>	<i>Prrn16</i> -139	TGGGATTGACGTGAGGG G GTAGGGGT	7/8	6/8

^a Nukleotide, an denen die Initiation stattfindet, sind unterstrichen. Promotormotive sind fett markiert. Die Anzahl der sequenzierten Klone für jeden Promotor ist angegeben zusammen mit der Häufigkeit des Auftretens des jeweiligen Transkript-5'-Endes, wie es in der TAP-behandelten RNA aus zwei Tage alten Keimlingen des Wildtyps (+T^{WT}) und vier Tage alten *sca3* Mutanten (+T^{sca3}) detektiert wurde. n.d., nicht detektiert.

IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression plastidärer Gene und ihre Regulation sowie die Wirkung äußerer Einflüsse auf die Genexpression der kernkodierten, plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp in Arabidopsis, ausgehend von unterschiedlichen Experimentalansätzen, untersucht. Dazu wurde (i) eine Auswahl von Promotoren plastidärer Gene von Arabidopsis charakterisiert. Die zu diesem Zweck hergestellten chlorophylldefizienten Pflanzen wurden (ii) eingehend auf der mRNA- und DNA-Ebene untersucht. Parallel dazu wurde (iii) unter Verwendung von Arabidopsis-Pflanzen mit integrierten *GUS*-Fusionskonstrukten mit Promotoren von *RpoTmp* und *RpoTp* die Wirkung von Licht und Salinität auf die Expression von RpoTmp und RpoTp analysiert. Abschließend wurden (iv) die individuellen Rollen der RpoTp und RpoTmp bei der Transkription plastidärer Gene aufgeklärt.

IV.1 Hohe Transkriptionsaktivität in weißen Plastiden von Arabidopsis trotz fehlender PEP-Aktivität

IV.1.1 Transkriptakkumulation im chlorophylldefizienten Gewebe von Arabidopsis

In dieser Arbeit wurden, unter Verwendung spectinomycinbehandelter, chlorophylldefizienter Arabidopsis-Pflanzen, Promotoren ausgewählter plastidärer Gene charakterisiert (s. Kap. III.1.2). Die Analyse der Transkript-5'-Enden mittels *5'-RACE* Methode und *Primer Extension* Assay hat im chlorophylldefizienten Gewebe mit fehlender PEP-Aktivität deutliche Unterschiede in der Akkumulation von NEP- und PEP-generierten Transkripten einzelner Gene gezeigt (s. Kap. III.1.2 und III.1.5). Um einen generellen Überblick über die Transkriptmengen im weißen spectinomycinbehandelten Gewebe von Arabidopsis zu bekommen, wurde neben der Transkriptakkumulation der drei *RpoT*-Gene auch die allgemeine Transkriptakkumulation in diesem Gewebe untersucht (s. Kap. III.1.3).

Transkriptakkumulation der *RpoT*-Gene im weißen Gewebe

Sowohl für die RpoTp, als auch für die RpoTmp wurde eine Funktion als NEP, also einer kernkodierten, plastidären RNA-Polymeraseaktivität postuliert (Chang et al., 1999; Hedtke et al., 1997; Lerbs-Mache, 1993; Liere et al., 2004) und in dieser Arbeit bestätigt (vergl. Kap. III.2.3). Die RpoTm dagegen wird exklusiv in die Mitochondrien importiert und

übernimmt dort die Transkription des Chondroms (Hedtke et al., 1997; Weihe et al., 1997; Young et al., 1998). Die Transkriptakkumulation der drei *RpoT*-Gene von Arabidopsis, welche die kernkodierten, organellenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen kodieren, wurde in chlorophylldefizienten, spectinomycinbehandelten Pflanzen im Vergleich zum grünen Blattgewebe detaillierter untersucht.

Die Analyse der Transkriptakkumulation mittels quantitativen *real-time*-PCR zeigt im grünen Blattgewebe unterschiedliche Expressionslevel der drei *RpoT*-Gene (Abb. 14). In Übereinstimmung mit Analysen von Emanuel *et al.* (2005) akkumuliert im grünen Blatt unter den *RpoT*-Transkripten *RpoTp* am stärksten und *RpoTmp* am schwächsten. Die Transkriptmengen von *RpoTp* und *RpoTmp* akkumulieren im chlorophylldefizienten Blattgewebe 2- (*RpoTp*) bis 3-fach (*RpoTmp*) höher als im grünen Blattgewebe (Abb. 14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Arabidopsis-Pflanzen mit deutlich verringerter PEP-Aktivität nicht nur die NEP-generierten Transkripte plastidärer Gene stärker akkumulieren (vergl. Kap. III.1.2; z. B. *rpoB*, Abb. 10b und Abb. 13b sowie *ycf2*, Abb. 12a), sondern auch die Transkripte der beiden Gene *RpoTp* und *RpoTmp*. Auch in der Tabak-Mutante $\Delta rpoA$ mit fehlender PEP-Aktivität wurde eine stärkere Akkumulation NEP-spezifischer Transkripte, wie z. B. *rpoB* und *accD*, beobachtet (Krause et al., 2000). Während die *NtaRpoTp*-mRNA in der $\Delta rpoA$ -Mutante deutlich stärker als im Wildtyp akkumulierte, blieben die Transkriptmengen von *RpoTmp* jedoch unverändert (Hedtke et al., 2002). Der spezifische Anstieg der *RpoTp*- und *RpoTmp*-Transkripte im Zusammenhang mit einer erhöhten Akkumulation an NEP-Promotoren generierter RNA-5'-Enden in Pflanzen mit verringerter und fehlender PEP-Aktivität deutet darauf hin, dass sowohl *RpoTp*, als auch *RpoTmp* an der NEP-Transkriptionsaktivität in den Plastiden beteiligt sind. Des Weiteren weisen Analysen vom transgenen Tabak (Liere et al., 2004) und von Arabidopsis-Mutanten mit partiell gehemmter (Tp5x) oder fehlender *RpoTp* (*sca3*; s. Kap. III.2.3 und IV.3.2) auf eine spezielle Rolle der *RpoTp* bei der Transkription von Typ-I NEP-Promotoren hin. Schließlich zeigen die *Primer Extension* Analysen aus dieser Arbeit eine spezielle Funktion der *RpoTmp* an der Transkription von sog. *non-consensus* Promotoren (vergl. Kap. III.2.3 und IV.3.2), was kürzlich auch durch andere Arbeiten bestätigt wurde (Courtois et al., 2007). In Arabidopsis sind das der Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 (Abb. 8c) und der Pc-Promotor *Prrn16*-139 (Abb. 8d). Obwohl sich diese Promotoren deutlich in ihrer Sequenz von den Typ-I NEP-Promotoren unterscheiden (s. Abb. 4 und Übersicht in Shiina et al., 2005), zeigen die Analysen der Arabidopsis-Mutanten *sca3* mit fehlender

RpoTp-Aktivität, dass die RpoTm nicht nur die Transkription der sog. *non-consensus* Promotoren bewerkstelligt, sondern auch die Rolle der RpoTp bei der Transkription der Typ-I NEP-Promotoren übernehmen kann (vergl. Kap. IV.3.2). Letzteres wird, im Zusammenhang mit der Tatsache, dass in Arabidopsis lediglich zwei Gene (*clpP* und *rrn16*) einen sog. *non-consensus* Promotor besitzen, auch dadurch gestützt, dass in weißen, spectinomycinbehandelten Pflanzen mit gehemmter PEP-Aktivität die Transkriptmengen von *RpoTm* stärker ansteigen als die von *RpoTp* (Abb. 14). Durch eine vermehrte Expression der RpoTm nimmt der Zellkern Einfluss auf die plastidäre Genexpression und ermöglicht eine Unterstützung der RpoTp bei der Transkription von Typ-I NEP-Promotoren.

Die Transkripte von *RpoTm* akkumulieren stärker im weißen als im grünen Gewebe (5-fach; Abb. 14). Obwohl die RpoTm keine Funktion in den Plastiden hat, wird ihre Expression indirekt durch die fehlende bzw. gehemmte Translation in nicht ausdifferenzierten Plastiden des spectinomycinbehandelten chlorophylldefizienten Gewebes beeinflusst. Der spezifische Anstieg der *RpoTm*-mRNA korreliert mit einer erhöhten Akkumulation mitochondrialer Zielgene im chlorophylldefizienten Blattgewebe (Abb. 15). Diese Daten aus Arabidopsis sind vergleichbar mit Untersuchungen der Gerstemutante *albostrians* (Emanuel et al., 2004). So wurde auch dort im plastidenribosomendefizienten Gewebe eine verstärkte Expression der RpoTm beobachtet, die zur Steigerung mitochondrialer Transkription führte. In diesem Zusammenhang zeigt die erhöhte Akkumulation der Transkripte von *RpoTm* und von mitochondrialen Genen in Pflanzen mit gestörter plastidärer Biogenese, dass die Entwicklung der Plastiden einen großen Einfluss auf die gesamte Entwicklung der pflanzlichen Zelle hat. In den Wechselwirkungen zwischen Chloroplasten und Mitochondrien scheinen retrograde Signale der einen Organelle über den Zellkern eine anterograde Kontrolle der jeweils anderen Organelle zu bewirken. So wurde in *Chlamydomonas reinhardtii* eine Steigerung der Expression nukleärer Photosynthesegene durch die Aktivierung der mitochondrialen Atmung gezeigt (Matsuo und Obokata, 2006). Ein weiteres Beispiel ist die Maismutante *ncs6* mit einer partiellen Deletion im Gen *cox2*, welches die UE II der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase kodiert. In dieser Mutante verursacht die Dysfunktion in der mitochondrialen Elektronentransportkette eine Verringerung in der Akkumulation von mRNAs einiger kern- und plastidenkodierten Komponenten des PS I, was zur verminderten Akkumulation des PS I in Chloroplasten führt (Jiao et al., 2005). Auch die gegenseitige Abhängigkeit komplexer plastidärer (O₂ und Malat; Lindemann et al., 2004) und mitochondrialer Metabolite (CO₂ und ATP;

Raghavendra und Padmasree, 2003) macht eine Abstimmung in der Biogenese beider Organellen notwendig. Obwohl bisher keine direkte Signalgebung zwischen Chloroplasten und Mitochondrien gezeigt wurde, könnte der gegenseitige Austausch von Redoxsignalen den organellären Redoxzustand verändern und die Expression des jeweils anderen Genoms beeinflussen (Allen, 1993; Baginsky und Link, 2005; van Lis und Atteia, 2004). Eine Redoxregulation der Aktivität der kernkodierten Phagentyp-RNA-Polymerasen wird vermutet. So wurde in *Arabidopsis* der indirekte Einfluss des Redoxstatus des plastidären Plastoquinonpools auf die Transkription der mitochondrialen RNA-Polymerase RpoTm im Zellkern beschrieben (Fey et al., 2005).

Transkriptakkumulation plastidärer und mitochondrialer Gene

In einer ersten Analyse wurde die Transkriptakkumulation von Genen, die für organelläre Funktionen kodieren, mittels *Microarrays* mit entsprechenden Gensequenzen untersucht. Da die *Microarrays* sowohl plastiden-, als auch mitochondrienkodierte Gensequenzen sowie Sequenzen kernkodierter Gene mit Funktionen in Chloroplasten oder Mitochondrien repräsentieren, ist ein Überblick über den Transkriptionsstatus beider Organellen im weißen und grünen Gewebe möglich. Transkripte plastidärer Gene und kernkodierter Gene mit Funktionen in Chloroplasten akkumulieren deutlich geringer in weißen spectinomycinbehandelten Pflanzen als im grünen Blattgewebe. Im Gegensatz dazu akkumulieren Transkripte mitochondrialer Gene und kernkodierter Gene für Komponenten der Atmung stärker in spectinomycinbehandelten chlorophylldefizienten Pflanzen als im grünen Blattgewebe (Abb. 15).

Die Expression organellärer Gene wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert (Gruissem und Tonkyn, 1993; Mayfield et al., 1995; Schuster et al., 1999). Obwohl die Expression der mitochondrialen (Binder und Brennicke, 2003; Giegé et al., 2000) und plastidären (Salvador et al., 1993) Gene hauptsächlich durch posttranskriptionelle Prozesse gesteuert wird, spielt die Transkription als regulatorisches Element eine wichtige Rolle (Link, 1996; Mackenzie und McIntosh, 1999; Pfannschmidt et al., 1999). Das weiße Blattgewebe enthält nicht ausdifferenzierte, ribosomendefiziente Plastiden (Zubko und Day, 1998). Das führt zur Reduktion oder zum Fehlen von plastidären Translationsprodukten, unter anderem auch der plastidenkodierten RNA-Polymerase PEP. Der Verlust der PEP verursacht die drastische Minderung in der Akkumulation der PEP-generierten Transkripte einer großen Anzahl plastidärer Gene (Abb. 15). Einige wenige NEP-generierte Transkripte (z. B. des *rpoB*-

Operons) akkumulieren stärker im chlorophylldefizienten Gewebe. Diese Eigenschaft ist für eine Unterscheidung zwischen NEP- und PEP-generierten Transkripten nutzbar und ermöglichte die Kartierung der plastidären Promotoren von Arabidopsis (s. Kap. III.2.1.1). Die verminderte Akkumulation von Transkripten kernkodierter Gene mit Funktionen in Chloroplasten, zeigt neben dem starken Rückgang in der Akkumulation PEP-generierter Transkripte in weißen Pflanzen, wie wichtig intakte Plastiden für die Expression bestimmter nukleärer Gene notwendig sind. Nicht ausdifferenzierte Plastiden scheinen veränderte intrazelluläre Signale zu übermitteln. Hinweise auf die Rolle der Plastiden bei der Expression nukleärer Gene ergaben bereits Analysen von Gerste- und *Pelargonium*-Mutanten mit Defizienz plastidärer Ribosomen. In diesen Mutanten waren Proteinnengen der plastidenlokalisierten, aber kernkodierten Enzyme deutlich reduziert (Boldt et al., 1992; Bradbeer und Börner, 1978; Hagemann und Börner, 1978). Auch unter dem Einfluss des Herbizids Norfluorazon, das die Carotinoidsynthese inhibiert und damit ausschließlich eine Wirkung in Chloroplasten hat (Reiss et al., 1983), war die Expression ausgewählter nukleärer Gene, die Proteine der Photosynthese kodieren, vermindert (Oelmüller, 1989). Da ein Großteil der plastidären Proteine kernkodiert ist und nach der Translation an cytoplasmatischen Ribosomen in die Chloroplasten importiert wird, ist eine Koordination zwischen der Expression des Plastoms und des Zellkerns von großer Bedeutung (Goldschmidt-Clermont, 1998). Untersuchungen der nukleären *run-on* Transkription und *Northern Blot* Analysen haben gezeigt, dass die verminderte Expression bereits auf der Ebene der Transkription erfolgt (Hess et al., 1991; 1994).

Die im Vergleich zum grünen im weißen Arabidopsis-Gewebe erhöhte Akkumulation von Transkripten mitochondrialer Gene stimmt mit Untersuchungen der Gerstemutante *albostrans* (Emanuel et al., 2004; Hedtke et al., 1999) und detaillierten Analysen mitochondrialer Gene in spectinomycinbehandelten, chlorophylldefizienten Arabidopsis-Pflanzen unterschiedlichen Alters (Tobias Preuten, unpublizierte Daten) überein. Ein Grund für den Anstieg mitochondrialer Transkripte könnte die Unfähigkeit sein, Photosynthese im chlorophylldefizienten Gewebe zu betreiben. In dieser Situation ermöglicht eine verstärkte Aktivität und Atmung in den Mitochondrien, den Energiebedarf der Zelle zu decken. In diesem Zusammenhang ist die kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerase *RpoTm* das Schlüsselenzym der mitochondrialen Genexpression. Die Transkripte von *RpoTm* akkumulieren 5-fach höher im weißen Gewebe im Vergleich zum grünen Blatt (Abb. 14). Die gesteigerte Expression der *RpoTm* treibt die verstärkte Akkumulation mitochondrialer Transkripte im weißen Gewebe an. Bei der Regulation dieser komplexen organellären

Interaktion spielt die Signalgebung innerhalb der pflanzlichen Zelle eine wichtige Rolle. Die an den Zellkern signalisierte fehlende Ausdifferenzierung der Plastiden im weißen Gewebe verursacht eine verstärkte Expression der *RpoTm*, was zur Steigerung der Transkription mitochondrialer Gene führt. Diese Signalgebung von Organellen zu Zellkern und die Wechselwirkungen zwischen den Organellen spielen also eine besonders wichtige Rolle bei der Expression der kernkodierte, organellenlokalisierte Phagentyp-RNA-Polymerasen. Dabei liegt für das Verständnis der Koordination der Genexpression der nukleären und organellären Genome die große Herausforderung darin, nicht nur die an der organellären Genexpression beteiligten Proteine zu identifizieren, sondern auch ihre Funktionsweise und die Prozesse und Wechselwirkungen, durch die sie kontrolliert werden. Da die organelläre Genexpression eher posttranskriptional reguliert wird, ist nicht nur die Untersuchung der Akkumulation der Transkripte, sondern auch der Proteine notwendig, um die Funktionsweise der anterograden Kontrolle durch den Zellkern zu verstehen. Das Wissen über die Mechanismen der retrograden Signale ist bisher limitiert. Weitere genetische und biochemische Analysen sollten helfen, die unbekannten Proteine und Signalwege zu identifizieren.

IV.1.2 Transkriptionsaktivität in weißen Plastiden

Die Analyse der Transkript-5'-Enden (Kap. III.1.2) und der Transkriptakkumulation (Kap. III.1.3) plastidärer Gene hat deutliche Unterschiede in Transkriptmengen einer großen Anzahl von Genen im chlorophylldefizienten Gewebe im Vergleich zum grünen Blattgewebe gezeigt. Transkripte von Photosynthesegenen (Abb. 15), aber auch tRNAs (Kap. III.1.5) akkumulieren auf deutlich geringerem Niveau im weißen als im grünen Gewebe. Im Gegensatz dazu sind die Transkriptmengen NEP-transkribierter Gene (z. B. das *rpoB*-Operon, Abb. 15; *PatpB*-318 und *Pycf1*-39, Abb. 13a) erhöht. Diese Beobachtung sowie die erhöhte Expression der kernkodierte, plastidenlokalisierte Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTp* und *RpoTmp* (Abb. 14) lassen auf eine erhöhte Transkriptionsaktivität der NEP im chlorophylldefizienten Gewebe schließen. Um das zu überprüfen, wurde die transkriptionelle Aktivität einiger ausgesuchter Gene mittels der *run-on* Transkription in Plastiden aus grünen- und chlorophylldefizienten Pflanzen analysiert.

Anders als Untersuchungen der Transkriptakkumulation ermöglicht die Analyse der organellären *run-on* Transkription, den Prozess der Transkription zu erforschen (Deng et al., 1987; Mullet und Klein, 1987). Derartige Analysen wurden mit Chloroplasten (Falk et al.,

1993; Hess et al., 1993) und Mitochondrien (Iqbal und Hudson, 1996) durchgeführt und haben ihren Nutzen bei der Untersuchung der relativen Transkriptionsaktivitäten organellärer Gene im Verlauf der Plastiden- und Blattentwicklung bewiesen (Deng und Gruissem, 1987; Deng et al., 1987). Darüber hinaus wurden *run-on* Analysen ebenso erfolgreich in Untersuchungen der Transkription in Plastiden aus grünem und weißem Gewebe von Spinat (Deng und Gruissem, 1988), Tabak (Legen et al., 2002) und Gerste (Hess et al., 1993) eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden erstmalig Analysen der relativen Transkriptionsaktivität in weißen, nicht ausdifferenzierten Plastiden aus spectinomycinbehandeltem, chlorophylldefizientem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* mittels organellärer *run-on* Transkription durchgeführt. Die Hybridisierung der *run-on* Transkripte an genspezifische DNA-Sonden aus dem Arabidopsis-Plastom zeigt, dass sowohl in weißen Plastiden, als auch in grünen Chloroplasten einige Regionen stark transkribiert werden (Abb. 16). Dabei werden, je nach Lokalisation im Genom, die Transkripte als Teil von unreifen mono- (z. B. *clpP*, *trnM*) und polycistronischen (z. B. *rrn16-trnI-trnA*) Vorläufermolekülen synthetisiert (Abb. 17).

Die meisten plastidären tRNA-Gene höherer Pflanzen sind in einzelnen Transkriptionseinheiten organisiert und werden an σ^{70} -Promotoren durch die PEP transkribiert (Sato et al., 1999; Wakasugi et al., 1986). Die Analyse der *run-on* Transkription zeigt, dass nicht nur in grünen, sondern auch in weißen Plastiden von Arabidopsis tRNA-Gene transkribiert werden. Diese Beobachtung korreliert mit Untersuchungen der Gartenbohne *Phaseolus vulgaris*. So wurden auch dort plastidäre tRNAs nicht nur im photosynthetisch aktiven Gewebe, sondern auch im nicht-photosynthetischen oder etiolierten Gewebe detektiert (Burkard et al., 1972; Merrick und Dure, 1972). Allerdings ist im Vergleich zu grünen Arabidopsis-Chloroplasten die Transkription der tRNA-Gene, anders als erwartet, nur in geringem Ausmaß durch die fehlende PEP-Aktivität in weißen Plastiden negativ betroffen (Abb. 17). Gerade der drastische weiße Phänotyp der chlorophylldefizienten Pflanzen (Abb. 7) und die deutlich reduzierten Transkriptmengen plastidärer Gene (Abb. 15) lassen eine stärkere Reduktion der Transkriptionsaktivität im weißen Gewebe annehmen. Die Analyse der *run-on* Transkription zeigt nur eine leicht abgeschwächte transkriptionelle Aktivität von *psbA* (Abb. 17, rechtes Panel), obwohl die entsprechende mRNA kaum akkumuliert (Abb. 8b). Analysen von Senf und Arabidopsis haben eine Co-Transkription von *psbA* mit

stromaufwärts liegendem *trnK*^{UUU} Gen gezeigt (Liere et al., 1995; Nickelsen und Link, 1991). Die transkriptionelle Aktivität von *psbA* wird in weißen Plastiden mit fehlender PEP-Aktivität möglicherweise durch die NEP-Transkriptionsaktivität des stromaufwärts lokalisierten Gens *trnK*^{UUU} verursacht.

Im Vergleich der transkriptionellen Aktivität mit der Transkriptakkumulation (s. Kap. IV.1.1) der plastidären Gene im weißen spectinomycinbehandelten Gewebe werden unabhängig von der Funktion des kodierten Genprodukts unterschiedliche Expressionsmuster deutlich. Die Mengen der akkumulierten Transkripte sind jedoch nicht nur von der Transkriptionsaktivität des jeweiligen Gens, sondern auch von ihrer Degradation abhängig. Das Zusammenspiel der Transkriptionsregulation mit der Kontrolle der Transkriptstabilität ist in Plastiden sehr komplex. Unterschiede in der Transkriptstabilität zwischen weißen und grünen Plastiden wurden z. B. für rRNA-Gene in der Gerstenmutante *albostrians* beschrieben (Börner und Hess, 1993; Hess et al., 1992; 1993a). Die RNA-Stabilität ist jedoch nicht nur von der photosynthetischen Aktivität während der Chloroplastenbiogenese (Übersicht in Monde et al., 2000), sondern auch von der synthetisierenden RNA-Polymerase abhängig (Cahoon et al., 2004). Gerade die geringe Stabilität der NEP-Transkripte wäre, trotz der deutlich stärkeren transkriptionellen Aktivität der NEP in weißen Plastiden von *Arabidopsis*, für die niedrige Akkumulation plastidärer Transkripte im weißen Gewebe ausschlaggebend. Die Stabilität und Degradation plastidärer Transkripte wird zudem oft durch regulatorische *cis*-Elemente bewerkstelligt, die hauptsächlich in 5'- und 3'-UTRs lokalisiert sind (Hayes et al., 1999; Schuster et al., 1999). Da die NEP und die PEP die Transkription an unterschiedlichen Promotoren initiieren, überschneiden sich die durch diese beiden Transkriptionsaktivitäten generierten primären RNA-5'-Enden nicht, was die Transkriptstabilität beeinflussen kann.

Plastidäre Gene sind häufig in polycistronische Transkriptionseinheiten organisiert, wodurch sie unterschiedlichen Prozessierungsschritten unterliegen (Herrmann et al., 1992; Igloi und Kössel, 1992). Aus diesem Grund ist die Auswertung der *Dot Blot*- und *Microarray*-basierten Expressionsprofile in Plastiden mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Transkription an eigenen, intracistronischen Promotoren einzelner, innerhalb von Operons lokalisierter Gene (Hajdukiewicz et al., 1997; Kapoor et al., 1994) sowie prozessierte und überlappende Transkripte mit unterschiedlicher Stabilität (Barkan, 1989; Westhoff und Herrmann, 1988) können zu abweichenden und komplexen Expressionsmustern führen. Die Mengen der akkumulierten RNAs unterscheiden sich bei Sonden gegen einzelne Transkripte sowie Sonden, welche eine Unterscheidung zwischen

Exon- und Intronbereichen ermöglichen, in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit bestimmter RNA-Moleküle. Zusätzlich befinden sich plastidäre Gene auf beiden DNA-Strängen des Plastoms (Sugiura, 1992). Aus diesem Grund können während der Transkription auf dem Gegenstrang lokalisierter Gene *Antisense*-RNAs entstehen. Die Hybridisierung von *run-on* Transkripten beider DNA-Stränge an genspezifische Amplifikate auf der Membran kann das Hybridisierungsmuster verändern und damit das Ergebnis der Analyse verfälschen. Studien von *Arpo*-Tabakmutanten haben jedoch gezeigt, dass die lokalen Mengen der *Antisense*-Transkripte in Wildtyp- und Mutanten-Plastiden vergleichbar sind, obwohl das Verhältnis zwischen der *Sense*- und der *Antisense*-RNA zwischen einzelnen Genen stark abweicht (Krause et al., 2000). Die Nutzung von *Antisense*-RNAs als Sonden statt doppelsträngiger DNA wäre eine Möglichkeit, die eventuelle Ungenauigkeit der Methode auszuschließen (Legen et al., 2002).

IV.1.3 Analyse des plastidären DNA-Gehaltes in Arabidopsis

Die Untersuchung der Transkriptakkumulation (vergl. Kap. III.1.3) und Transkriptionsaktivität (vergl. Kap. III.1.4) plastidärer Gene hat eine allgemein verringerte plastidäre Genexpression in chlorophylldefizienten Pflanzen mit gehemmter PEP-Aktivität gezeigt. Um einen möglichen Einfluss der plastidären DNA-Menge auf die veränderte Genexpression in weißen Plastiden zu analysieren, wurde die Plastomkopienzahl im chlorophylldefizienten Gewebe untersucht.

Um die Plastomkopienzahl im weißen und grünen Gewebe zu bestimmen, wurde die quantitative *real-time*-PCR, angeglichen an die Kopienzahl des Gens für 18S-rRNA, verwendet. Während in grünen Blättern ca. 800 Plastomkopien pro Zelle ermittelt wurden, variierte in gleichaltrigen weißen Blättern die Plastomkopienzahl pro Zelle um den Wert 2000 (Abb. 21). Die Zahl der Plastomkopien im grünen Gewebe liegt unterhalb der publizierten Werte von 1100 bis 1900 Plastomkopien pro Zelle in Blättern von *Beta vulgaris* (Tymms et al., 1983) und 1000 bis 1700 Plastomkopien pro Zelle während der gesamten Blattentwicklung von *Arabidopsis thaliana* (Zoschke et al., 2007). Die erhöhte Plastomkopienzahl im weißen Gewebe dagegen unterscheidet sich deutlich von bisher bekannten Daten für das nicht-grüne Gewebe. So wurden während der Amyloplastenformation in Zellsuspensionen von Spinat 1125 Plastomkopien pro Zelle (Aguettaz et al., 1987) und in der Arabidopsis-Wurzel lediglich 20 Plastomkopien pro Zelle beobachtet (Isono et al., 1997).

Der Anstieg der Plastomkopienzahl pro Zelle im weißen Gewebe kann durch eine erhöhte Anzahl von plastidären Chromosomen pro Plastide aber auch durch eine erhöhte Anzahl der Plastiden pro Zelle erklärt werden. Ersteres würde aus einer verstärkten DNA-Replikation des Plastoms resultieren. Proteine, die an der Replikation der plastidären DNA beteiligt sind, werden durch nukleäre Gene kodiert (*Arabidopsis*-Genome-Initiative, 2000; Herrmann undFeierabend, 1980). Da die Analyse der Transkriptakkumulation im weißen Gewebe einen negativen Einfluss von Spectinomycin auf die Akkumulation der Transkripte von Kerngenen mit Funktionen in Plastiden gezeigt hat (vergl. Kap. III.1.3), ist eine verstärkte DNA-Replikation des Plastoms eher unwahrscheinlich. Obwohl die plastidäre Proteinbiosynthese durch Spectinomycin unterbunden wird, bleibt der kernkodierte Teilungsmechanismus der Plastiden unbeeinflusst erhalten (Zubko undDay, 1998). Eine der wichtigsten Ebenen, auf welcher die Plastidenteilung reguliert werden kann, ist die Anpassung der Größe der Zellen, wobei die Anzahl der Plastiden pro Zelle eng mit der Zellgröße korreliert (Cookson et al., 2003; Possingham undLawrence, 1983). An dieser Stelle spielt die Zellteilungsaktivität eine wichtige Rolle. Analysen von Tabak haben einen essentiellen Zusammenhang zwischen der plastidären Proteinbiosynthese und der Blattentwicklung gezeigt. So führt das Fehlen einer aktiven plastidären Proteinbiosynthese, wie es unter Wirkung von Spectinomycin geschieht, zur Aufhebung der Entwicklung der Blattspreiten aufgrund arretierter Zellteilung (Ahlert et al., 2003). Eine geringere Zellteilungsrate, z. B. verursacht durch Mutationen (Asano et al., 2004), kann auch unter Einfluss von Spectinomycin zu einer Anreicherung/Verdichtung von Plastiden innerhalb der Zelle führen. In Untersuchungen des plastidären DNA-Gehaltes in der *Arabidopsis*-Mutante *var2* (*yellow variegated2*, Mutante mit gescheckten Blättern durch weiße Blattsektoren) mit Methoden der DNA-Färbung durch Fluoreszenzfarbstoffe *DAPI* und *SYBR Green* wurden größere DNA-Nukleotide in Zellen der weißen Bereiche als in Zellen der grünen Bereiche gezeigt (Kato et al., 2007). Die Autoren schlussfolgern daraus einen Anstieg des DNA-Gehaltes in Plastiden der weißen Blattbereiche. Im Gegensatz dazu wurden in ribosomendefizienten Plastiden der Albinoblätter der Gerstenmutante *albostrians* vergleichbare Mengen der plastidären DNA und ähnliche Teilungsraten wie in grünen Chloroplasten beobachtet (Hashimoto undPossingham, 1989). Auch Hess *et al.* (1993a) haben keine Veränderungen in der DNA-Sequenz der Plastoms der ribosomendefizienten Plastiden von *albostrians* durch Deletionen, Duplikationen oder Inversionen detektieren können. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die hohe Anzahl der Plastomkopien pro Zelle aus einer erhöhten Plastidenzahl pro Zelle im spectinomycinbehandelten,

chlorophylldefizienten Gewebe resultiert. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass für die Untersuchung der *run-on* Transkription (s. Kap. IV.1.2) weniger vom weißen als vom grünen Gewebe gebraucht wurde (Daten nicht gezeigt), um vergleichbar viele Plastiden zu isolieren. Weitere Experimente, wie z. B. licht- oder elektronenmikroskopische Analysen der Keimblattentwicklung könnten Aufschluss über die Zellteilungsaktivität im weißen Gewebe geben.

Die Hexaploidie der Zellkerne im weißen Gewebe (s. S. 62) könnte bei der Erhöhung der Plastomkopienzahl eine Rolle spielen. Eine erhöhte Anzahl und Expression der nukleären Gene für plastidäre Proteine wäre eine Möglichkeit, die Plastidenzahl in der Zelle zu erhöhen. Diese funktionelle Rolle der Endopolyploidie wird allerdings nicht durch Untersuchungen vom grünen *Arabidopsis*-Gewebe von Zoschke *et al.* (2007) gestützt. Doch gerade in Zellen, die künstlich induzierten Veränderungen durch Spectinomycin ausgesetzt sind, könnte diese Funktion ein möglicher Weg sein, auf diesen Stressfaktor zu reagieren.

Die erhöhte Plastomkopienzahl im weißen Gewebe in Verbindung mit verstärkter Akkumulation NEP-generierter Transkripte (vergl. Kap. IV.1.1) führt zu der Schlussfolgerung, dass die verringerte Genexpression in weißen Plastiden aus der starken Reduktion der PEP-getriebenen Transkription und nicht aus einem verringerten plastidären DNA-Gehalt im chlorophylldefizienten Gewebe resultiert.

IV.2. Nutzungsvielfalt plastidärer Promotoren in *Arabidopsis thaliana*

IV.2.1 Identifizierung von Initiationsstellen der Transkription

Der heutige Wissensstand über die plastidären Promotoren dikotyler Pflanzen basiert hauptsächlich auf Untersuchungen von Tabak und Spinat. Nur wenig ist über die plastidären Promotoren in *Arabidopsis thaliana* bekannt, obwohl *Arabidopsis* eine der wichtigsten Modellpflanzen der modernen Pflanzengenetik ist. In dieser Arbeit konnte eine Gruppe ausgewählter plastidärer Gene hinsichtlich ihrer Transkriptionsstartpunkte erfolgreich untersucht werden. Für die Identifikation und Sequenzanalyse sowie die Unterscheidung zwischen NEP- und PEP-Promotoren wurden RNAs aus spectinomycinbehandelten, chlorophylldefizienten (Abb. 7) und unbehandelten *Arabidopsis*-Pflanzen verglichen (Zubko und Day, 1998). Die Verbindung der 5'-RACE Analyse mit einer enzymatischen Behandlung der RNAs (Abb. 5) ermöglichte eine Unterscheidung zwischen primären und sekundären 5'-Enden der RNAs (Bensing *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 2005).

Die Identifizierung bereits bekannter NEP- und PEP-Promotoren (Abb. 8) bestätigte die Annahme, durch die Verwendung spectinomycinbehandelter Pflanzen zwischen diesen beiden Promotortypen unterscheiden zu können. Interessanterweise konnten geringe Transkriptmengen einiger PEP-transkribierter Gene (z. B. *psbA*, Abb. 8b) in RNAs aus spectinomycinbehandelten Pflanzen detektiert werden. Dieses wurde auch für spectinomycinbehandelte Albino-Pflanzen von *Brassica napus* beschrieben, obwohl das D1-Protein dort nicht detektiert werden konnte (Zubko und Day, 1998). Vergleichbar dazu wurden im weißen Arabidopsis-Gewebe deutlich geringere, jedoch noch detektierbare Mengen der 16S-rRNA beobachtet. Diese wurden am Pc-Promotor *Prrn16-139* generiert, wie in *Primer Extension* Analysen gezeigt werden konnte (Abb. 13b). Die plastidäre Genexpression wird für einzelne Gene altersspezifisch reguliert. In Untersuchungen von monokotylen Pflanzen wurde ein entwicklungsabhängiger Gradient innerhalb der Blätter vom basalen Meristem mit jüngsten Zellen zur Blattspitze mit seneszenten Zellen beobachtet. Dabei wurde in Gerste ein drastischer Anstieg in der allgemeinen Transkriptionsaktivität in Plastiden der jungen basalen Blattzellen gezeigt, während sie in älteren grünen Bereichen abfiel und in Zellen der Blattspitze nur gering war (Baumgartner et al., 1989). Auch die Akkumulation bestimmter plastidärer Transkripte ist alters- und entwicklungsabhängig. So wurde in reifen Maisblättern eine Verminderung der Stabilität der *rpl23*-Transkripte (Cahoon et al., 2004) und in älteren Rosettenblättern von Arabidopsis eine Abnahme der Transkriptmengen von *rrn16* gezeigt (Zoschke et al., 2007). Ähnlich dazu nahmen in Erbsenblättern mit zunehmendem Alter die Transkriptmengen der Gene *rrn16* sowie *trnfM/G* und *trnK* ab (DuBell und Mullet, 1995). Die Prozessierung plastidärer tRNAs in höheren Pflanzen erfolgt unverzüglich nach ihrer Transkription (Cheng et al., 1997). Für unprozessierte Vorläufermoleküle von *trnK* wurde in Gerstekeimlingen eine Halbwertszeit von drei Stunden bestimmt (Kim et al., 1993). Aufgrund dieser Unterschiede in der Stabilität und Akkumulation konnten die primären 5'-Enden von Transkripten einiger Gene nicht im 21 Tage alten grünen und weißen Gewebe detektiert werden. Dies gelang jedoch unter Verwendung weiterer Gewebearten, wie Blühmeristem, vier Tage alte Keimlinge, noch nicht gekeimte Samen sowie sieben Tage alte bei 10°C auf Spectinomycin angezogene Keimlinge.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Transkriptionsstartpunkte der Gene *accD*, *atpB*, *atpI*, *psbI*, *rpl23*, *rpoB*, *rps4*, *rps8*, *rps15*, *ycf1*, *ycf2*, *ycf6*, *trnC*^{GCA}, *trnE*^{UUC}, *trnG*^{UCC}, *trnG*^{GCC}, *trnK*^{UUU}, *trnL*^{UAA}, *trnM*^{CAU}, *trnfM*^{CAU}, *trnS*^{GGA}, *trnT*^{GGU} und *trnV*^{GAC} kartiert werden (Abb. 9 bis Abb. 12 und Abb. 40, für *psbI* und *ycf6* Daten nicht gezeigt). Es wurden

dabei PEP-Promotoren (Abb. 40a; *PatpB*-520, *PatpI*-229, *PpsbI*-44, *Prps4*-123, *Pycf1*-34, *Pycf6*-53, *PtrnC*^{GCA}-221, *PtrnC*^{GCA}-138, *PtrnE*^{UUC}-27, *PtrnG*^{UCC}-3, **PE1***trnK*^{UUU}-104, **PE2***trnK*^{UUU}-191, *PtrnL*^{UAA}-143, *PtrnM*^{CAU}-44, *PtrnM*^{CAU}-72, *PtrnT*^{GGU}-50, *PtrnT*^{GGU}-33 und *PtrnV*^{GAC}-22) sowie NEP-Promotoren (Abb. 40b; *PaccD*-252, *PaccD*-172, *PatpB*-318, *Prpl23*-68, *PrpoB*-376, *PrpoB*-300, *Prps4*-151, *Prps8*-208, *Prps8*-66, *Prps15*-139, *Pycf1*-104, *Pycf1*-39, *Pycf2*-1629, *Pycf2*-1506, *Pycf2*-1040, *PtrnG*^{GCC}-130, *PtrnG*^{UCC}-15, **PE2***trnK*^{UUU}-92, *PtrnS*^{GGA}-232 und *PtrnT*^{GGU}-46) identifiziert. Interessanterweise wurden für die tRNA-Gene *trnA*^{UGC}, *trnE*^{UUC}, *trnI*^{GAU}, *trnL*^{UAA}, *trnM*^{CAU} und *trnT*^{GGU} putative Transkriptionsinitiationsstellen an der Position +1 des jeweiligen Gens beobachtet (s. Tab. 10, unten). Früher beschriebene, putative Initiationsstellen aus Arabidopsis für *rpoB* (*PrpoB*-563; Inada et al., 1997) und *accD* (*PaccD*-89; Hanaoka et al., 2005) konnten allerdings selbst mit der äußerst sensitiven 5'-*RACE* Methode in keinem Gewebe bestätigt werden. Erstaunlicherweise zeigen diese Studien, dass einige plastidäre Promotoren sehr weit stromaufwärts vom Translationsstartpunkt lokalisiert sein können. Insbesondere gilt das für die Promotoren des *ycf2* Gens, welche, ähnlich wie für Tabak beschrieben (*NtaPycf2*-1577; Hajdukiewicz et al., 1997) von 1,0 kb bis zu 1,6 kb stromaufwärts lokalisiert sind (Abb. 12a). Die Funktion dieses anscheinend essentiellen Gens ist allerdings bisher noch nicht aufgeklärt worden (Drescher et al., 2000), sodass über eine Rolle des langen 5'-UTRs an der Regulation dieses Gens nur spekuliert werden kann.

Promotoren plastidärer tRNA-Gene

Die in dieser Arbeit verwendete *run-on* Transkription ermöglichte die Untersuchung der Transkriptionsaktivität in grünen und weißen Plastiden und hat gezeigt, dass plastidäre tRNA-Gene sowohl in grünen, als auch in chlorophylldefizienten Pflanzen transkribiert werden (Kap. III.1.4). Der Einsatz der bewährten Methode der 5'-*RACE* Analyse erlaubte die Aufklärung der Promotorstruktur einiger plastidärer tRNA-Gene von Arabidopsis (Kap. III.1.5). Für den Hauptteil der tRNA-Gene wurden PEP-Promotoren detektiert (Abb. 40a). Wie erwartet, wurden diese hauptsächlich im grünen Blattgewebe lokalisiert. Die Analyse der *run-on* Transkription hat gezeigt, dass in grünen Chloroplasten tRNA-Gene aktiv transkribiert werden (Kap. III.1.4). Somit ist es also möglich, trotz der schnellen Prozessierung der tRNAs (Liere und Link, 1994; Liere und Börner, 2007; Neuhaus und Link, 1987), ihre primären Transkripte zu detektieren.

Für die meisten plastidären tRNA-Gene höherer Pflanzen wurden Promotorelemente des eubakteriellen Typs mit typischen -35/-10-Sequenzelementen beschrieben. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen dieser Arbeit. Die Promotorbereiche der Gene *trnE*^{UUC}, *trnG*^{UCC}, *trnM*^{CAU}, *trnV*^{GAC} sind in höheren Pflanzen konserviert (Kanamaru et al., 2001). So wird z. B. *trnG*^{UCC} sowohl in Tabak (NtaPtrnGUUC-6; Meng et al., 1991), als auch in Arabidopsis von einem hoch konservierten PEP-Promotor transkribiert (Abb. 40a; PtrnG^{UCC}-3). Ähnlich dazu ist der PEP-Promotor von *trnV*^{GAC} in Mais (ZmPtrnVGAC-24; Strittmatter et al., 1985) und Arabidopsis sowie der PEP-Promotor von *trnK*^{UUU} in Senf (SaPtrnKUUU-121; Neuhaus und Link, 1987) und Arabidopsis konserviert (Abb. 40a; PtrnV^{GAC}-22 und PE1*trnK*^{UUU}-104). Das Gen *trnK*^{UUU} ist durch ein Intron der Gruppe IIA unterbrochen (Vogel et al., 1997). Die Promotoranalyse hat zwei weitere putative Transkriptionsinitiationsstellen von *trnK*^{UUU} hervorgebracht, welche sich im Intron stromaufwärts des 3'-Exons befinden (Abb. 19a, *trnK*^{UUU}-b; PE2*trnK*^{UUU}-191 und PE2*trnK*^{UUU}-92). Eine introninterne Initiation der Transkription ist bisher nicht beschrieben worden. Für einen kleinen Teil der Transkripte wurde in Senf und Arabidopsis eine Co-Transkription von *trnK*^{UUU} mit dem stromabwärts lokalisierten *psbA* Gen beobachtet (Liere et al., 1995; Nickelsen und Link, 1991). Dabei könnte eine introninterne Initiation der Transkription eine gewebspezifische Funktion haben. Bis jedoch Intronbereiche weiterer plastidärer Gene nach Transkriptionsinitiationsstellen untersucht werden können, bleibt die Frage nach ihrer Rolle in der Transkriptionsinitiation und ihrem Vorkommen im plastidären Genom noch zu klären. Die Analyse der Promotorbereiche von *rrn16* und *psbA* hat gezeigt, dass Transkripte, die an starken PEP-Promotoren initiiert werden, auch im weißen, spectinomycinbehandelten Gewebe detektierbar sind (Abb. 13b und c). Im Gegensatz dazu konnten die am PEP-Promotor Ptrn*fM*^{CAU}-72 initiierten RNA-5'-Enden in geringen Mengen als einzige in chlorophylldefizienten Pflanzen detektiert werden (Abb. 18a), obwohl für alle kartierten PEP-Promotoren der tRNA-Gene vergleichbar starke Signale detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). Auch in ribosomendefizienten Plastiden der Gerstenmutante *albostrians* wurden geringe Spuren der Formylmethionin-tRNA gefunden (Hess et al., 1993). Die primären Transkripte von *trnM*^{CAU} scheinen während der gesamten pflanzlichen Entwicklung zu akkumulieren, da die an Ptrn*fM*^{CAU}-72 initiierten RNA-5'-Enden auch in noch nicht gekeimten Samen und im Blühmeristem lokalisiert werden konnten (Tab. 10).

Sehr interessant ist die Beobachtung, dass sich stromaufwärts von einigen tRNA-Genen Bereiche mit Sequenzähnlichkeiten zu Typ-I NEP-Promotoren befinden (Abb. 40b). Keiner dieser NEP-Promotoren konnte im grünen Blattgewebe lokalisiert werden. Dies könnte auf

eine gewebsspezifisch alternative Promotornutzung auch für tRNA-Gene hindeuten. Die Analyse der *run-on* Transkription hat eine Aktivität der NEP bei der Transkription der tRNA-Gene in weißen Plastiden gezeigt (Kap. III.1.4). Daher ist es denkbar, dass stromaufwärts von tRNA-Genen auch Erkennungssequenzen der NEP lokalisiert sein können. Die Promotorregion von *trnG*^{UCC} ist in höheren Pflanzen nicht stark konserviert. In Reis wird eine Co-Transkription von *trnG*^{UCC} mit den stromaufwärts lokalisierten, PEP-transkribierten Genen *psbD-psbC* vermutet (Kanno und Hirai, 1993; Kim et al., 1999). Im Gegensatz dazu führt in hellgrünen *sig2-1* Mutanten von Arabidopsis die Defizienz im plastidären Transkriptionsfaktor AtSig2 zum Anstieg in der Akkumulation NEP-generierter Transkripte von *rps15*, *accD* und *clpP* sowie von tRNAs *trnG*^{UCC} und *trnE*^{UUC} (Kanamaru et al., 2001). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Transkription der tRNA-Gene durch die NEP im nicht-grünen Gewebe sein.

Zusätzlich wurden interessanterweise in dieser Studie hauptsächlich im nicht-grünen Gewebe für die Gene *trnA*^{UGC}, *trnE*^{UUC}, *trnI*^{GAU}, *trnL*^{UAA}, *trnM*^{CAU} und *trnT*^{GGU} primäre Transkript-5'-Enden detektiert, die an der Position +1 des jeweiligen Gens beginnen (s. Tab. 10, unten). Stromaufwärts dieser Initiationsstellen wurden keine bekannten Promotorelemente detektiert. Frühere Analysen haben eine Transkription plastidärer tRNA-Gene ohne stromaufwärts lokalisierte Promotorelemente gezeigt. So wird die Transkription der Gene *trnR*, *trnS* und *trnT* im Spinat (Cheng et al., 1997; Grissem et al., 1986) sowie der Gene *trnS*, *trnH*, und *trnR* im Senf (Liere und Link, 1994; Neuhaus und Link, 1990; Neuhaus et al., 1990; Nickelsen und Link, 1990) an internen Promotoren bewerkstelligt. In Spinat wurde der Transkriptionsstartpunkt des *trnS* Gens an der Position -12 stromaufwärts der kodierenden Region der reifen tRNA charakterisiert (Wu et al., 1997). Analysen von Mutanten mit Deletionen verschiedener Länge im 5'-Bereich des Gens haben eine deutliche Abnahme der *in vitro*-Transkription mit zunehmender Länge des deletierten Fragments gezeigt. Obwohl der direkt stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt lokalisierte AT-reiche Bereich zwischen den Positionen -31 und -11 besonders wichtig für die Transkriptionseffizienz war, wurden dort keine Sequenzelemente von PEP- oder NEP-Promotoren detektiert. Der kodierende Bereich von *trnS* beinhaltet jedoch Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu A- und B-Boxen nukleärer tRNA-Promotoren, welche durch die eukaryotische RNA-Polymerase III transkribiert werden (Galli et al., 1981; Geiduschek et al., 1995). Für das *trnR*^{ACG} Gen von *Pelargonium zonale* wurde eine Transkription im Zellkern der Oozyte von *Xenopus* gezeigt (Hellmund et al., 1984), was auf die mögliche Transkription plastidärer tRNA-Gene durch eine plastidäre Transkriptionsaktivität mit

Ähnlichkeit zur RNA-Polymerase III hindeutet. Eine solche plastidenlokalisierte RNA-Polymerase wurde jedoch bisher nicht identifiziert. Da die an der Position +1 beginnenden, primären Transkript-5'-Enden der tRNAs hauptsächlich im nicht-grünen Gewebe detektiert wurden, könnte eine solche Initiation der Transkription gewebsspezifisch sein. Spezialisierte Transkriptionsaktivitäten der NEP könnten in Verbindung mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren an der Erkennung solcher interner Promotoren und somit an der Transkription dieser tRNA-Gene beteiligt sein. Dies wäre vor allem für essentielle tRNAs denkbar, da diese auch im Fall fehlender PEP-Aktivität in Plastiden bereitgestellt werden müssen. Ein Beispiel dafür ist die tRNA^{Glu}, welche nicht nur für die Proteinbiosynthese von Bedeutung, sondern auch an den ersten Schritten der Biosynthese von Tetrapyrrolen und Chlorophyll beteiligt ist (Howe und Smith, 1991; Jahn et al., 1992; Schön et al., 1986). Die Enzymzusammensetzung und die biochemischen Eigenschaften dieser Transkriptionsaktivität bleiben durch weitere Experimente zu klären.

Multiple Promotoren sind in Chloroplasten von Arabidopsis weit verbreitet

Das *atpB* Gen wird in Tabak an mindestens drei PEP- (Nta*PatpB*-611, Nta*PatpB*-502/-488, Nta*PatpB*-255) und zwei NEP-Promotoren (Nta*PatpB*-329, Nta*PatpB*-289) transkribiert (Hajdukiewicz et al., 1997). Ähnlich wie in Mais (Silhavy und Maliga, 1998) wird *atpB* in Arabidopsis nur von dem PEP-Promotor *PatpB*-520 und dem NEP-Promotor *PatpB*-318 abgelesen. Obwohl die Sequenzen der PEP-Promotoren Nta*PatpB*-488 und Nta*PatpB*-611 in Tabak und die stromaufwärts von *atpB* liegende Region in Arabidopsis konserviert sind, werden sie hier nicht genutzt. Ähnliches kann auch für *clpP* und *rrn16* beobachtet werden, deren Promotorregionen hoch konserviert sind, jedoch in verschiedenen Pflanzen von RNA-Polymerasen unterschiedlichen Typs an anderen *cis*-Elementen transkribiert werden (Baeza et al., 1991; Sriraman et al., 1998).

Auch die Promotorregion von *ycf2* ist in Arabidopsis und Tabak hoch konserviert. Die DNA-Sequenz, die in Tabak durch die NEP als Promotor genutzt wird (Nta*Pycf2*-1577; Hajdukiewicz et al., 1997), ist in Arabidopsis jedoch durch eine 16 nt lange Insertion inaktiviert, welche das YRTA-Motiv und die Transkriptionsinitiationsstelle trennt. Die Transkription von *ycf2* wird in Arabidopsis an drei NEP-Promotoren initiiert (Abb. 40b; *Pycf2*-1629, *Pycf2*-1506 und *Pycf2*-1040). Ähnlich wie in Tabak (Hajdukiewicz et al., 1997) sind diese NEP-Promotoren nicht in grünem Blattgewebe aktiv (Abb. 12a).

In der Gerste wird *rpl23* (Hübschmann und Börner, 1998) wie auch in Arabidopsis von einem hoch konservierten NEP-Promotor transkribiert (Abb. 40b; *Prpl23*-68, *HvPrpl23*-73). Interessanterweise wird die Transkription von *rps8*, welches Teil des *rpl23*-Operons ist, eigenständig an zwei innerhalb des Operons lokalisierten NEP-Promotoren initiiert (Abb. 40b; *Prps8*-208, *Prps8*-66).

Die Promotorregionen der Gene *accD*, *atpI*, *psbI*, *rps4* und *rpoB* sind zwischen den bisher untersuchten höheren Pflanzen anscheinend nicht hoch konserviert. Sowohl *accD*, als auch *rpoB* werden zwar in Tabak und in Arabidopsis durch die NEP transkribiert, jedoch in Tabak jeweils von einem Promotor aus (*NtaPaccD*-129, *NtaPrpoB*-345; Hajdukiewicz et al., 1997; Liere und Maliga, 1999), während sie in Arabidopsis von zwei NEP-Promotoren transkribiert werden (*PaccD*-252 und *PaccD*-172; *PrpoB*-376 und *PrpoB*-300). Auch *rps15* wird ausschließlich von der NEP am Promotor *Prps15*-139 transkribiert, was frühere Studien in Gerste (Hess et al., 1993) und Mutanten von Arabidopsis (Nagashima et al., 2004) bestätigt.

Das innerhalb eines Genclusters zwischen *psbK* und *trnG*^{UCC} lokalisierte *psbI* Gen (Wakasugi et al., 1998) wird in Tabak in einer polycistronischen mRNA vom PEP-Promotor *NtaPpsbK*-163 transkribiert (Meng et al., 1991). Auch in Arabidopsis wird *psbI* durch die PEP transkribiert, jedoch von einem eigenständigen Promotor, welcher zwischen den kodierenden Bereichen von *psbK* und *psbI* lokalisiert ist (Abb. 40a; *PpsbI*-44). Eine Co-Transkription mit dem stromaufwärts liegenden *psbK* Gen kann allerdings anhand der erhaltenen Daten nicht ausgeschlossen werden. Hierzu müssten weitere Transkriptanalysen dieser Region durch RNase Schutzkartierung und/oder *Northern Blot* Assays erfolgen.

ycf6 ist das kleinste, konservierte offene Leseraster im plastidären Genom höherer Pflanzen. Es wird auch als *petN* bezeichnet und kodiert die Untereinheit VIII des Cytochrom *b₆f*-Komplexes (Hager et al., 1999). In *Physcomitrella patens* wurde eine Transkription von *petN* in Abhängigkeit von der konstitutiv exprimierten, plastidenlokalisierten, aber kernkodierten α -Untereinheit der PEP (*PpRpoA1*) gezeigt (Kabeya et al., 2007). In Arabidopsis wird *ycf6* ebenfalls durch die PEP transkribiert (Abb. 40a; *Pycf6*-53). Die Transkription der Gene für Komponenten des Cytochrom *b₆f*-Komplexes scheint PEP-abhängig zu sein. So wurde in Tabakmutanten Δ *rpoA* mit fehlender PEP-Aktivität eine deutlich verringerte Transkriptionsaktivität und Transkriptakkumulation der Gene *petN*, *petB*, *petD* und *petL* beobachtet (Legen et al., 2002).

[illegible]

Eine DNA-Sequenz dient verschiedenen RNA-Polymerasen zur Transkriptionsinitiation

Das *ycfI* Gen wird sowohl in Tabak (Hajdukiewicz et al., 1997), als auch in Arabidopsis von einem hoch konservierten NEP-Promotor transkribiert (Abb. 40b; *PycfI*-39, *NtaPycfI*-41). Neben dem weiteren NEP-Promotor *PycfI*-104, der sowohl im Blatt, als auch in der Blüte aktiv ist, kann die Transkription im grünen Blattgewebe von dem PEP-

Promotor *PycfI*-34 übernommen werden. *PycfI*-34 ist an der Position des NEP-Promotors *PycfI*-39 lokalisiert (Abb. 41a) und damit neben der Promotorregion vom *rrn16* Gen, die in *Arabidopsis* sowohl einen PEP-, als auch einen Pc-Promotor trägt (Abb. 41b), ein weiteres Beispiel dafür, dass eine einzige DNA-Sequenz als Promotor für die NEP, als auch für die PEP dienen kann.

Obwohl die Promotorregion von *clpP* zwischen den bisher untersuchten Pflanzen hoch konserviert ist, wird die Transkription dieses Gens von verschiedenen RNA-Polymerasen an unterschiedlichen *cis*-Elementen initiiert. So wird das *clpP* Gen in Tabak von zwei Typ-I NEP-Promotoren (Nta*PclpP*-173, Nta*PclpP*-511), einem PEP-Promotor (Nta*PclpP*-95) und einem Typ-II NEP-Promotor (Nta*PclpP*-53; Hajdukiewicz et al., 1997; Sriraman et al., 1998) transkribiert. Das Maisgen dagegen wird an einem einzigen Typ-I NEP-Promotor transkribiert (Zm*PclpP*-111; Silhavy und Maliga, 1998).

In dieser Studie hat die 5'-*RACE* Analyse der Promotorregion von *clpP* in *Arabidopsis* den erwarteten Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58, jedoch nicht den PEP-Promotor *PclpP*-115, bestätigt (Abb. 8c, Sriraman et al., 1998). Im Gegensatz dazu hat die Analyse der Transkript-5'-Enden in älteren spectinomycinbehandelten Pflanzen (Abb. 13c) und in jungen etiolierten Keimlingen auf Spectinomycin (Abb. 31) mittels *Primer Extension* Assay gezeigt, dass sowohl die am Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58, als auch die am PEP-Promotor *PclpP*-115 initiierten Transkripte deutlich stärker als in unbehandelten Keimlingen akkumulieren. Diese Beobachtung, in Verbindung mit der verstärkten Expression von *RpoTp* und *RpoTmp* im weißen, spectinomycinbehandelten Gewebe (Abb. 14), weist darauf hin, dass der Promotor *PclpP*-115, anders als in Tabak, eher von der NEP als, wie bisher angenommen, von der PEP zur Transkriptionsinitiation genutzt werden könnte (Sriraman et al., 1998; Zoschke et al., 2007). Auch die Analyse von *Arabidopsis*-Mutanten mit fehlender *RpoTp*-Aktivität unterstützt diese Annahme. So akkumulieren, ähnlich wie an den Typ-I NEP-Promotoren *PycfI*-39 und *PatpB*-318, die am Promotor *PclpP*-115 initiierten Transkripte nicht in jungen Mutantenkeimlingen (Abb. 38d). Direkt stromaufwärts von *PclpP*-115 befinden sich typische -35/-10 Promotorkonsensusmotive eines PEP-Promotors. Zusätzlich ist der Transkriptionsstartpunkt auch Teil der Sequenz **CATTAATTTAA** mit Sequenzähnlichkeit zum YRTA-Konsensusmotiv von Typ-I NEP-Promotoren (Abb. 41c). Aus diesem Grund könnte dieser Promotor aber auch von beiden Polymeraseaktivitäten erkannt werden, in grünen Blättern von der PEP und im weißen Gewebe von der NEP. Dieses wäre, neben den Promotoren von *ycfI* und *rrn16*, ein Beispiel für eine DNA-

a *ycf1*

-35 -10

TAT **ATGGAA** ---- AGTTGCAAAATCAT **CATA** **TAATA** **AT** TCCAG **GAA** ATTG

YRTA Pycf1-39 Pycf1-34

b *rrn16*

-35 -10

GGA **TTGACG** -- TGAGGG **GG** TAGGGGTAGC **TATATT** TCTGGGAGCG **GA** AC

Prrn16-139 Prrn16-112

c *clpP*

-35 -10

ATT **TTAGCT** TATTCAACTTATGTATTAA **TATCATT** AATTT **AA** ATATG

YRTA? PclpP-115

IV.2.2 Nutzungsvielfalt plastidärer Promotoren

Die Nutzungsvielfalt der plastidären Promotoren in verschiedenen Pflanzen deutet auf eine speziesspezifische Kontrolle der Genexpression in Plastiden hin. Obwohl einige Gene von einzelnen Promotoren transkribiert werden, scheint die Transkription plastidärer Gene und Operons an multiplen Promotoren verbreitet zu sein (Abb. 42). Andere Studien zeigen sowohl Co-Transkription mit anderen Genen in Operons, als auch Transkription an individuellen Promotoren innerhalb von Operons (z. B. *trnG* und *psbA*; zusammengefasst in Liere und Börner, 2007). Obwohl die Rolle der meisten multiplen Promotoren plastidärer Gene und Operons bisher nicht vollständig geklärt ist, sind einige sehr gut charakterisiert. Das Operon *psbD-psbC* wird insgesamt von drei unterschiedlichen Promotoren transkribiert (Hoffer und Christopher, 1997; Sexton et al., 1990; Wada et al., 1994; Yao et al., 1989). Der innerhalb höherer Pflanzen hoch konservierte blaulichtabhängige Promotor (BRLP) des Operons *psbD-psbC* ist in der Lage die Synthese und den Austausch photogeschädigter Komponenten des PS II, das sind das D2-Protein des Reaktionszentrums und das interne

Antennenprotein CP43, in reifen Chloroplasten zu steuern (Christopher und Mullet, 1994). In ähnlicher Weise akkumulieren monocistronische Transkripte von *petE* im Licht, wohingegen polycistronische Transkripte des Genclusters *petL-petE-psaJ* in Dunkelheit an einem weiter stromaufwärts lokalisierten Promotor initiiert werden (Haley und Bogorad, 1990).

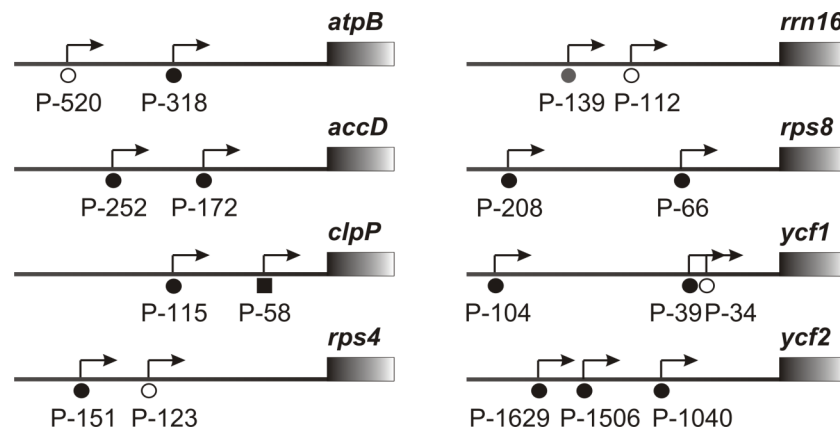


Abb. 42: Plastidäre Gene in Arabidopsis mit multiplen Promotoren. In der schematischen Darstellung sind die multiplen PEP- (○) und Typ-I NEP-Promotoren (●) sowie der Typ-II NEP- (■) und der Pc-Promotor (●) von Arabidopsis-Genen mit ihrer Position im Abstand zum Translationsstartpunkt (+1) angegeben. Darstellungen nicht maßstabsgerecht.

Neben der Mannigfaltigkeit plastidärer Promotoren in Arabidopsis und anderen höheren Pflanzen, stützt die Analyse der Transkriptionsinitiationsstellen aus dieser Arbeit die folgenden Schlussfolgerungen aus Transkriptionsstudien in Tabak bezüglich der Promotornutzung. Gemischte NEP- und PEP-Promotoren befinden sich stromaufwärts von Haushaltsgenen, da diese in der gesamten plastidären Entwicklung transkribiert werden müssen. NEP-Promotoren werden hauptsächlich im jungen und im nicht-grünen Gewebe am Anfang der pflanzlichen Entwicklung abgelesen, während die PEP die Transkription in reifen photosynthetisch aktiven Chloroplasten übernimmt (Baumgartner et al., 1993; Bisanz-Seyer et al., 1989; Emanuel et al., 2004; Kapoor et al., 1997). In Tabakmutanten *Δrpo* ohne PEP-Aktivität werden durch die NEP sehr lange Transkripte initiiert, welche das gesamte Plastom abdecken (Krause et al., 2000; Legen et al., 2002). Untersuchungen der Entwicklungsstadien in Maisblättern zeigen jedoch, dass in reifen Chloroplasten die Stabilität der NEP-Transkripte abnimmt, obwohl die transkriptionelle Aktivität der NEP steigt (Cahoon et al., 2004). Das deutet darauf hin, dass die Struktur plastidärer Transkripte nicht nur auf eine erlesene Promotornutzung und die Aktivität der jeweiligen RNA-Polymerase, sondern auch auf posttranskriptionelle Prozesse zurückgeht. Haushaltsgene,

wie das *rps15* Gen sowie das *rpoB*- und das *rpl23*-Operon, unterliegen ausschließlich der NEP-getriebenen Transkription, was ein Hinweis darauf ist, dass die NEP für die Genexpression und ihre Regulation auch in reifen Chloroplasten wichtig ist. Sowohl die NEP, als auch die PEP sind während der gesamten Blattentwicklung aktiv, obwohl die PEP die Hauptrolle in reifen Blättern zu spielen scheint (Demarsy et al., 2006; Zoschke et al., 2007). Interessanterweise kodieren ausschließlich durch die PEP transkribierten Gene für Proteine mit Funktion in der Photosynthese. Frühere Daten zeigen die PEP als ein hervorragendes Ziel für Regulationssignale einschließlich der Redoxkontrolle, was bisher für die NEP nicht gezeigt werden konnte (Forsberg et al., 2001; Liere und Maliga, 2001; Pfannschmidt und Liere, 2005). Eine Eliminierung sowohl der Photosynthesegene, als auch der PEP-Promotoren in parasitären Pflanzen (Berg et al., 2004; Krause et al., 2003; Wolfe et al., 1992; 1992) deutet darauf hin, dass die PEP-getriebene Transkription und Regulation der Genexpression eng mit der Photosynthese verbunden ist.

IV.3. Regulation der Transkription

IV.3.1 Regulation der Genexpression von *RpoTmp* und *RpoTp* sowie ihrer Zielgene

Um den Einfluss bestimmter Lichtqualitäten auf die Genexpression der plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTmp* und *RpoTp* zu untersuchen, wurde ihre gewebsspezifische Expression in transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit integrierten *PRpoT::GUS*-Fusionskonstrukten analysiert. Des Weiteren wurde untersucht, in welchem Ausmaß die Expression der plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen mit der Genexpression ihrer Zielgene übereinstimmt. Dazu wurde zunächst die Induktion der Transkription ausgewählter plastidärer Gene durch Weißlicht mittels *Primer Extension* Analyse untersucht.

Licht induziert den gewebsspezifischen Wechsel der Expression von *RpoTmp*

Wie bereits von Emanuel *et al.* (2005) beschrieben, gibt es sowohl räumliche, als auch zeitliche Unterschiede in der Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTmp* und *RpoTp* in *Arabidopsis*. Während unter Belichtung die *GUS*-Expression unter der Kontrolle des *RpoTmp*-Promotors bereits in den ersten Tagen der pflanzlichen Entwicklung in der Wurzelspitze beobachtet wurde (Abb. 22a), konnte die *RpoTp*-getriebene *GUS*-Aktivität erst

in grünen, photosynthetisierenden Primärblättern nachgewiesen werden (Abb. 22b und Modell Abb. 43). Vergleichbare Resultate zeigt die Analyse der Akkumulation der *RpoT*-Transkripte in Keimlingen und Blättern verschiedenen Alters mittels quantitativer *real-time*-PCR (Tobias Preuten, unpublizierte Daten). Die *RpoTmp* wird, wie auch die *RpoTm*, in die Mitochondrien importiert und ist dort an der Transkription mitochondrialer Gene beteiligt (Hedtke et al., 1997; 2000; 1999). Für mitochondriale Gene (Li et al., 1996) und nukleäre Gene, die mitochondriale Komponenten kodieren (Elorza et al., 2004; Ribichich et al., 2001), wurden höhere Transkriptmengen im Wurzelgewebe mit hoher Zellteilungsaktivität beobachtet. Diese zell- und gewebsspezifische Expression resultiert aus der Notwendigkeit höherer mitochondrialer Biogenese in diesem Gewebe und erklärt die *RpoTmp*-getriebene *GUS*-Aktivität in der Wurzelspitze.

Interessanterweise induziert in etiolierten Pflanzen der *RpoTmp*-Promotor die *GUS*-Expression in den kaum ausgebildeten Keimblättern (Abb. 25a, A1), nicht aber in der Wurzelspitze (B1) und damit anders als im Licht (Abb. 25b). Dies könnte ein Hinweis auf eine besondere Funktion der *RpoTmp* bei der plastidären Genexpression in Dunkelheit sein (s. Modell Abb. 43). Regulatorische *cis*-Elemente scheinen dabei einen Einfluss auf die Stärke der *RpoTmp*-getriebenen *GUS*-Expression zu haben. Während in Dunkelheit für die Expression von *RpoTmp* in Keimblättern ein langer Promotorbereich benötigt wird, ist ein kurzer Promotorbereich für die lichtinduzierbare Transkription des *RpoTmp*-Gens in der Wurzel ausreichend (Abb. 22). Dieser Wechsel der *RpoTmp*-Expression von Keimblättern zu Wurzel könnte durch regulatorische Elemente zur gewebsspezifischen Expression hervorgerufen werden. Für solche *cis*-Elemente wurde eine Rolle bei der Reaktion auf Stressfaktoren, wie UV-B-Strahlung, Hitze, Trockenheit, Kälte und andere, mehrfach beschrieben (Übersicht in Ernst und Aarts, 2004). Die relative Lage von *cis*-Elementen zum Transkriptionsstartpunkt und zu anderen regulatorischen Elementen ist dabei für die Kontrolle der Genexpression bedeutend. Um die genaue Lage der Elemente zu ermitteln, sollten detaillierte Untersuchungen der Sequenz des *RpoTmp*-Promotors, z. B. durch Promotormutagenese, durchgeführt werden. Die Untersuchung weiterer Lichtwellenlängen hat gezeigt, dass Blau- und Dunkelrotlicht bereits nach 15 Stunden die *RpoTmp*-getriebene *GUS*-Expression in etiolierten Keimblättern vollständig abklingen lässt und diese in der Wurzel stimuliert (Abb. 25d und e). Auch Rotlicht aktiviert die *RpoTmp*-Expression in der Wurzelspitze etiolierter Keimlinge, scheint aber die *RpoTmp*-Expression in den Keimblättern kaum abklingen zu lassen (Abb. 25c). Diese Beobachtung weist auf eine mögliche Beteiligung von Photorezeptoren an der Regulation der Expression der

plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen hin. Diese könnte über den baulicht-spezifischen Transduktionsweg vom Zellkern zum Chloroplasten ablaufen, ähnlich wie die Regulation der Genexpression von AtSig5, einem kernkodierten, plastidären σ -Faktor der plastidären RNA-Polymerase PEP, dessen Transkription durch Blaulicht, jedoch nicht durch Rotlicht initiiert wird (Tsunoyama et al., 2002). Dieser Regulationsmechanismus ist nicht nur an der Genexpression kernkodierter Gene mit Funktionen in Plastiden beteiligt, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Transkription plastidärer Gene. So hat in reifen, dunkeladaptierten Arabidopsis-Blättern Rotlicht nur einen schwachen positiven Effekt auf die plastidäre Transkription, während Blaulicht einen starken Anstieg der gesamten Transkriptionsaktivität in Chloroplasten verursacht (Chun et al., 2001; Thum et al., 2001).

Die Umwandlung von Etioplasten in photosynthetisch-aktive Chloroplasten wird durch eine große Anzahl von Komponenten ermöglicht. Dabei spielen Photorezeptoren eine wichtige Rolle. Unterschiedliche Lichtwellenlängen aktivieren verschiedene Sätze von Photorezeptoren (Ma et al., 2001). Chlorophylle, sowie alle Mitglieder der Phytochromfamilie werden durch Rotlicht aktiviert, Cryptochrome und Phototropine hingegen sind spezifische Photorezeptoren des Blaulichts (Casal und Yanovsky, 2005; Cashmore et al., 1999; Kasahara et al., 2002). Pflanzliche Phytochrome und Cryptochrome sind nicht nur für das Lichtempfinden verantwortlich, sondern haben auch einen Einfluss auf die nukleäre Genexpression (Thum et al., 2001). Die bekannteste Wirkung vom Phytochrom A (PhyA) ist die Deetiolierung in Dunkelheit gekeimter Pflanzen. Dabei verursacht die lichtinduzierte Reaktion des PhyA die Hypokotylhemmung sowie die Expansion der Kotyledonen und ist essentiell für die Biosynthese des Photosyntheseapparates. Ausgehend von der Photoreaktion führen durch Phytochrom induzierte Prozesse zur Veränderung der Genexpression, sowohl Aktivierung als auch Reprimierung der Expression einer großen Anzahl kernkodierter Gene (Ma et al., 2001; Tepperman et al., 2001). Dabei kodieren circa die 50 % der Gene, deren Expression verstärkt ist, Proteine der Chloroplasten. Während der lichtinduzierten Pflanzenentwicklung ist auch Blaulicht ein sehr wichtiger Regulator der Expression plastidärer Gene sowie nukleärer Gene, wie z. B. *RBCS*, welches die kleine Untereinheit der RuBisCo kodiert (Mohr, 1994). So wurde gezeigt, dass an einigen durch Phytochrome aktivierten Signalwegen auch Cryptochrome (Cry) beteiligt sind, welche unter anderem die durch Blaulicht induzierte Hypokotylinhibition und Keimblattentwicklung bewirken (Ahmad et al., 1998; Lin et al., 1996). Für Cry 1 und Cry 2 wurde unter bestimmten Lichtbedingungen

eine direkte Interaktion mit PhyA und PhyB demonstriert (Ahmad et al., 1998; Más et al., 2000). Des Weiteren haben Untersuchungen in *Arabidopsis* gezeigt, dass Cryptochrom gemeinsam mit dem Phototropin NPH1 die Hypokotylhemmung reguliert (Folta und Spalding, 2001). Die von den Lichtrezeptoren vermittelten Transduktionswege sind häufig mit anderen Faktoren, wie z. B. Temperatur oder Hormone, gekoppelt (Franklin und Whitelam, 2004; Seo et al., 2006) und ermöglichen der Pflanze eine Anpassung der Entwicklung und des Wachstums an die sich verändernden Lichtbedingungen. Dabei spielt die gewebsspezifische Abstimmung der Expression von *RpoTmp* als eine der plastidenlokalisierten RNA-Polymerasen eine besonders wichtige Rolle. Inwiefern die unterschiedlichen Lichtrezeptoren bei der *RpoTmp*-Expression in Kotyledonen und in der Wurzel etiolierter Keimlinge bei Belichtung eine reprimierende oder aktivierende Rolle spielen, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Hierzu würden Analysen der Expression der *RpoT*-Gene in verschiedenen Lichtrezeptormutanten Aufschluss geben.

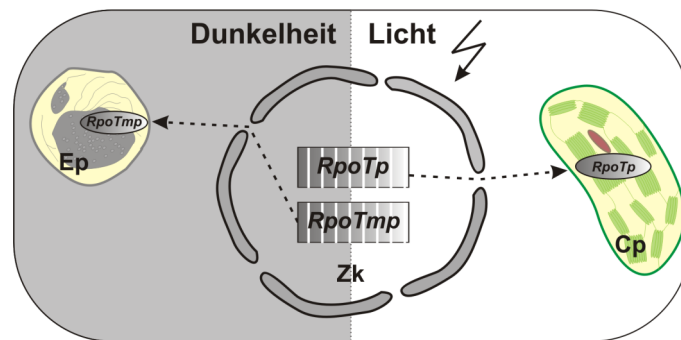


Abb. 43: Modell der möglichen Funktionen der plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen in unterschiedlichen Plastidentypen in *Arabidopsis thaliana*. Während die *RpoTmp* hauptsächlich an der Transkription plastidärer Gene im nicht-photosynthetisierenden Gewebe beteiligt ist, scheint die *RpoTp* die vorherrschende kernkodierte Transkriptionsaktivität im grünen Gewebe zu sein. **Ep**, Etioplast; **Cp**, Chloroplast; **Zk**, Zellkern. Abbildung nicht maßstabsgerecht.

Die *GUS*-Expression unter der Kontrolle vom *RpoTp*-Promotor wurde durch keine der Lichtqualitäten beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchungen sind jedoch nicht ausreichend, um verlässliche Aussagen über die mögliche Regulation der *RpoT*-Expression durch die verschiedenen Wellenlängen zu treffen, da in den untersuchten, frühen Entwicklungsstadien die Stärke der lichtinduzierten *RpoTp*-Expression möglicherweise unter der Nachweisgrenze der Aktivität des *GUS*-Reportergens liegt. Dafür sprechen Analysen der Transkriptakkumulation der drei *RpoT*-Gene von *Arabidopsis* mittels quantitativer *real-time*-PCR, die eine Aktivierung der Expression von *RpoTp* im etiolierten

Gewebe durch verschiedene Lichtqualitäten zeigen (T. Preuten, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus zeigen die in dieser Arbeit mittels *Primer Extension* Analyse erhaltenen Daten über die Nutzung plastidärer Promotoren in etiolierten Keimlingen eindeutig eine lichtinduzierte Expression einiger plastidärer NEP-transkribierter Gene (Kap. III.2.2).

Der Nachweis der *RpoTp*-getriebenen *GUS*-Aktivität in grünen, photosynthetisierenden Primärblättern, aber nicht in Kotyledonen (Abb. 22b; Emanuel et al., 2005), könnte auf einen Anstieg der *RpoTp*-Aktivität im grünen Gewebe mit zunehmender Plastidenentwicklung hindeuten. Ähnliche Beobachtung brachten Untersuchungen der NEP-Transkriptionsaktivität in Mais, welche in dieser monokotylen Pflanze auf eine einzelne Phagentyp-RNA-Polymerase *RpoTp* zurückgeht (Chang et al., 1999). So hat die Analyse der Maisblätter, trotz der Abnahme der *RpoTp*-Enzymmengen, eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität der NEP innerhalb des Entwicklungsgradienten der Chloroplasten gezeigt (Cahoon et al., 2004). Im Gegensatz zu diesem Anstieg der NEP-Aktivität nimmt die Stabilität der NEP-Transkripte in reifen Chloroplasten ab, was zur Folge hat, dass die NEP-Transkripte auf einem konstanten Niveau akkumulieren. Eine solche starke Korrelation zwischen der NEP-Aktivität und der Transkriptakkumulation ihrer Zielgene wurde jedoch in *Arabidopsis* bisher nicht beschrieben (Zoschke et al., 2007).

Wirkung von Salzstress auf die Expression von *RpoTmp* und *RpoTp*

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von abiotischem Stress auf die Expression nukleärer Komponenten des plastidären Genexpressionssystems. Ein Beispiel dafür sind die kernkodierten, plastidären σ -Faktoren der plastidären RNA-Polymerase PEP. So wird die Expression von *AtSig5* in *Arabidopsis* durch einige abiotische Faktoren, unter anderem durch hohe Salinität sowie hohe Osmolarität und geringe Temperatur, aktiviert (Nagashima et al., 2004). In dieser Arbeit wurde erstmalig die Auswirkung des abiotischen Faktors Salinität auf die Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTmp* und *RpoTp* erfolgreich untersucht. Mittels der histochemischen β -Glukuronidase Analyse konnte ein erster Hinweis auf den Einfluss der Salinität auf die Genexpression der plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen *RpoTp* und *RpoTmp* gezeigt werden (Abb. 26). Sowohl der *RpoTp*-, als auch der *RpoTmp*-Promotor aktiviert die *GUS*-Expression in grünen Blättern in Anwesenheit einer hohen Salzkonzentration. In beiden Fällen ist die *GUS*-Expression am längeren Promotorfragment stärker ausgeprägt. Das weist darauf hin, dass in weiter stromaufwärts lokalisierten Regionen der beiden Promotoren

regulatorische Elemente lokalisiert sind, welche die Expression von *RpoTmp* und *RpoTp* unter veränderten Umweltbedingungen beeinflussen können.

Die *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit integrierten Fusionskonstrukten *PRpoTmp::GUS* und *PRpoTp::GUS* und die Transkriptanalyse mittels quantitativer *real-time*-PCR in Wildtyp-Pflanzen, welche veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt sind, bieten die Möglichkeit, Effekte weiterer abiotischer Faktoren auf die *RpoT*-Expression zu untersuchen.

Verstärkte Expression von *RpoTmp* und *RpoTp* im chlorophylldefizienten Gewebe

Die Analyse der *RpomTp*- und *RpoTp*-getriebenen *GUS*-Expression im spectinomycinbehandelten, chlorophylldefizienten Gewebe zeigt eine deutlich verstärkte Expression der beiden plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen im gesamten Keimling (Abb. 27). Diese Beobachtung korreliert mit den erhöhten Transkriptmengen der beiden *RpoT*-Gene in diesem Gewebe (Abb. 14). Das weiße, nicht-photosynthetisierende Gewebe ohne PEP-Aktivität ist auf eine erhöhte Expression der *RpoTmp* und *RpoTp* angewiesen, um die Transkription plastidärer Gene zu bewerkstelligen. Ähnlich dazu wurde in weißen Blattbereichen der Gerstenmutante *albostrians* im Vergleich zu grünen Blattabschnitten eine erhöhte Expression der *RpoTp* beobachtet (Emanuel et al., 2004). Trotz vereinzelter Überschneidungen ist ihre Lokalisation räumlich getrennt, also gewebsspezifisch. In der Wurzelspitze wird auch in chlorophylldefizienten Pflanzen *GUS* ausschließlich unter der Kontrolle des *RpoTmp*-Promotors exprimiert (Abb. 27a). Diese Daten korrelieren mit Analysen der Wurzel in grünen, spectinomycinunbehandelten *PRpoTmp::GUS*-Keimlingen von *Arabidopsis* in dieser Arbeit (Abb. 22) sowie in früheren Arbeiten von Emanuel et al. (2005) und bestätigen die spezifische Rolle der *RpoTmp* in diesem nicht-grünen Gewebe. Neben der *RpoTp* ist die *RpoTmp* die zweite kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerase, die an der Transkription mitochondrialer Gene und damit an der Biogenese der Mitochondrien beteiligt ist (Hedtke et al., 1997; 2000; 1999). Die Schlüsselfunktion der Mitochondrien ist die Produktion von ATP durch oxidative Phosphorylierung, deren hohe Aktivität gerade während des vegetativen Wachstums von großer Wichtigkeit ist (Saraste, 1999). Die starke *RpoTmp*-getriebene *GUS*-Expression in der Wurzel resultiert aus der hohen Zellteilungsaktivität im Meristem der Streckungs- und Teilungszone der Wurzelspitze und fehlt aufgrund mangelnder Zellteilung in der Wurzelhaube. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von Mais- und Sonnenblumenkeimlingen überein, welche eine Korrelation der Mengen mitochondrialer

Transkripte (Li et al., 1996) und nukleärer Transkripte mit mitochondrialen Funktionen mit der Zellteilungsaktivität im Wurzelgewebe aufgezeigt haben (Ribichich et al., 2001). Neben der Wurzelspitze zeigen die spectinomycinbehandelten *PRpoTmp::GUS*-Keimlinge auch eine GUS-Färbung in den Leitbündeln und im Parenchym der Keimblätter. Dabei nimmt die Stärke der GUS-Färbung von der Basis zur Spitze der Keimblätter ab, was ein Hinweis auf einen möglichen Abfall der Transkriptionsaktivität der *RpoTmp* innerhalb des Keimblattes, zur Blattspitze hin, ist. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von *Triticum aestivum* überein. So nehmen die Transkriptmengen bestimmter mitochondrialer Gene von der Basis bis zur Spitze junger Blätter von Weizenkeimlingen ab (Topping und Leaver, 1990).

Im Gegensatz zur *GUS*-Expression unter der Kontrolle des *RpoTmp*-Promotors, ist die *RpoTp*-getriebene *GUS*-Expression ausschließlich in den Leitbündeln und im Parenchym der Keimblätter, jedoch nicht in der Wurzel der spectinomycinbehandelter Keimlinge sichtbar (Abb. 27b). Die *RpoTp* scheint das vorherrschende Enzym im Parenchym der Keimblätter zu sein und wird gleichmäßig exprimiert. Ersteres korreliert mit früheren Daten von *Arabidopsis*, in denen für die *RpoTp* eine spezifische Rolle in dem unter Normalbedingungen grünem, photosynthetisch-aktivem Blattgewebe vermutet wurde (Emanuel et al., 2005). Letzteres stimmt nicht mit Analysen von jungen Weizenkeimlingen überein. So wurde dort ein Anstieg der Transkriptmengen plastidärer Gene und nukleärer Gene für plastidäre Proteine von der Basis bis zur Blattspitze beschrieben (Topping und Leaver, 1990). Diese Beobachtung in *Arabidopsis* resultiert allerdings aus der Wirkung von Spektinomycin, die einen generellen Anstieg der *RpoTp*-Expression in allen Zellen des Parenchyms verursacht, und in spectinomycinunbehandelten Keimlingen nicht sichtbar ist.

Licht induziert die Expression an PEP- und ausgewählten Typ-I NEP-Promotoren

Die Analyse der *GUS*-Expression unter der Kontrolle der Promotoren von *RpoTmp* und *RpoTp* hat einen lichtinduzierten, gewebspezifischen Wechsel der *RpoTmp*-Expression von etiolierten Keimblättern zur Wurzelspitze gezeigt (Kap. III.2.1.1). Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, inwiefern diese veränderte Expression der plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerase mit der Expression ihrer plastidären Zielgene in etiolierten Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* nach unterschiedlich langer Belichtung korreliert. Dazu wurde die Akkumulation von RNA-5'-Enden, die an ausgewählten plastidären Promotoren initiiert werden, mittels *Primer Extension Assay* analysiert. Um die

Lichtinduktion der plastidären Transkription auch in Pflanzen ohne PEP-Aktivität untersuchen zu können, wurden zusätzlich spectinomycinbehandelte Keimlinge untersucht (Abb. 28b).

Die Analyse der Akkumulation von Transkripten, welche an PEP-Promotoren initiiert werden, hat Unterschiede zwischen den einzelnen Promotoren aufgezeigt. Die Transkription am starken PEP-Promotor *PpsbA-77* (Abb. 29a und c) und dem schwachen PEP-Promotor *Pycf1-34* (Abb. 33a und c) wird durch Licht bereits innerhalb der ersten Stunde induziert. Doch während in drei Tage alten Keimlingen die folgende Lichtgabe mit einem weiteren Anstieg in der Transkriptakkumulation korreliert, bleiben die Transkriptmengen in sieben Tage alten Keimlingen unverändert.

Die lichtabhängige Veränderung von Transkriptmengen plastidärer Photosynthesegene wurde bereits mehrfach gezeigt. Ähnlich wie in Mais (Bedbrook et al., 1978) und Senf (Hughes et al., 1987), verursacht die Belichtung in Arabidopsis einen Anstieg in der Akkumulation der *psbA*-Transkripte. Diese ist jedoch nicht strikt lichtabhängig. So sind die Transkripte von *PpsbA-77* bereits im etiolierten Gewebe von Arabidopsis detektierbar (Abb. 29, Spur 1). Auch in Tabak wurde eine Akkumulation von *psbA*-Transkripten in etiolierten Keimlingen beobachtet (Staub und Maliga, 1993). Im Gegensatz dazu akkumuliert dort das von *psbA* kodierte D1-Protein des PS II nur unter Belichtung. Auch in etiolierten Gerstekeimlingen akkumuliert die *psbA*-mRNA auf hohem Niveau (Klein und Mullet, 1986). Im Gegensatz zu Gerste wurde in Arabidopsis (Abb. 29a) und Tabak (Staub und Maliga, 1993) ein Anstieg in der Transkriptakkumulation nach Belichtung beobachtet. Möglicherweise ist die Regulation der Genexpression der plastidären Photosynthesegene unterschiedlich in dikotylen (Arabidopsis, Tabak) und monokotylen (Gerste) Pflanzen. Die Unterschiede in der Expression von *psbA* zwischen Gerste und Arabidopsis könnten aber auch aus dem unterschiedlichen Entwicklungsstadium des verwendeten Gewebes resultieren. In Gerste wurde die Untersuchung mit Primärblättern etiolierter Keimlinge durchgeführt. Da Arabidopsis-Keimlinge in Dunkelheit keine Primärblätter bilden, wurde die Analyse von kompletten Keimlingen mit Kotyledonen durchgeführt.

Im Gegensatz zu *PpsbA-77* und *Pycf1-34* führt bei *rrn16* Licht zu einem Anstieg in der Akkumulation PEP-generierter Transkripte in älteren (*Prrn16-112*, Abb. 32c), jedoch nicht in jüngeren Keimlingen (Abb. 32a). Dabei akkumulieren die Transkripte von *Prrn16-112* nach drei Tagen bereits höher als nach sieben Tagen Etiolement. Im Gegensatz zu PEP-Promotoren wird die Transkription vom Pc-Promotor *Prrn16-139* nicht durch Licht aktiviert. In viereinhalb Tage alten etiolierten Gerstekeimlingen wurde innerhalb von

24 Stunden Belichtung eine drastische Abnahme der Transkriptionsaktivität von *rrn16* beobachtet, die mit einem Abfall der Menge von 16S rRNA einherging (Mullet und Klein, 1987). In *Arabidopsis* konnte keine Verminderung der Transkriptmengen von *rrn16* beobachtet werden. Hierbei könnte die hohe Stabilität der 16S rRNA entscheidend sein (Kim et al., 1993).

Interessanterweise hat Licht auch einen Einfluss auf die Transkription von Typ-I NEP-Promotoren. So steigen die Mengen von Transkripten, welche an *PrpoB*-300 (Abb. 30a und c) und *Pycf1*-39 (Abb. 33a und c) initiiert werden, in sieben Tage alten Keimlingen bereits nach einer Stunde und in drei Tage alten Keimlingen nach vier Stunden unter Licht. Die Akkumulation der Transkripte von *PrpoB*-300 und *Pycf1*-39 scheint im etiolierten Gewebe entwicklungsabhängig zu sein. Die Transkriptmengen steigen von drei zu sieben Tage alten Keimlingen an (Abb. 30a und c, Spur 1). Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen der Transkriptakkumulation von *rpoB* in der Erbse. So wurden in fünf Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen nur geringe Transkriptmengen von *rpoB* detektiert, während sie nach zwei weiteren Tagen in Dunkelheit deutlich anstiegen (DuBell und Mullet, 1995). Im Unterschied zu *PrpoB*-300 und *Pycf1*-39 wird die Transkription vom Typ-I NEP-Promotor *Pycf1*-104 in jungen und in älteren etiolierten Keimlingen durch Licht induziert (Abb. 33a und c), wobei die Transkripte in jungen Keimlingen kaum detektierbar sind.

Im Gegensatz zu den Typ-I NEP-Promotoren hat Licht keinen Einfluss auf die Transkription von Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58. Die an diesem Promotor initiierten Transkripte akkumulieren bereits in drei Tage alten etiolierten Keimlingen auf hohem Niveau (Abb. 31a). Der folgende Verbleib der Keimlinge in Dunkelheit lässt die Transkriptmengen von *PclpP*-58 weiter ansteigen (Abb. 31c).

Die Analyse der Akkumulation PEP-generierter Transkripte hat gezeigt, dass nach dem Etiolement nicht nur im jungen Gewebe (*PpsbA*-77 und *Pycf1*-34), sondern auch im älteren Gewebe (*Prrn16*-112) die plastidäre Transkription durch Licht reaktiviert werden kann. Dabei ist die Akkumulation PEP-generierter Transkripte größtenteils lichtunabhängig.

Die Analyse der Transkriptakkumulation von RNA-5'-Enden, welche an Typ-I NEP-Promotoren gebildet werden, hat gezeigt, dass auch die NEP-getriebene Transkription an diesen Promotoren durch Licht beeinflusst wird. Hierbei gibt es allerdings zeitliche Unterschiede. Während die Transkription von *PrpoB*-300 und *Pycf1*-39 bereits nach drei Tagen Etiolement durch Licht induziert wird, wird der Promotor *Pycf1*-104 erst nach sieben Tagen in Dunkelheit durch Licht induziert. Im Gegensatz dazu wird die Transkription an dem sog. *non-consensus* Typ-II-NEP-Promotor *PclpP*-58 und dem Pc-Promotor

Prrn16-139 im etiolierten Gewebe nicht durch Licht beeinflusst. Auch in spectinomycinbehandelten etiolierten Keimlingen mit gehemmter PEP-Aktivität gibt es keinen Einfluss des Lichts auf die Transkription dieser Promotoren. Obwohl dort die Transkripte von *PclpP-58* und *Prrn16-139* stärker akkumulieren (Abb. 31b und d sowie Abb. 33b und d) als in unbehandelten Keimlingen, bleiben sie nach Belichtung konstant.

Da die Lichtinduktion der Transkription von plastidären Promotoren mit Keimlings-Gesamt-RNA untersucht wurde, können keine Schlussfolgerungen bezüglich der möglichen Korrelation mit der gewebspezifischen Expression der Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp (III.2.1.1) gemacht werden. Diese Analyse sollte mit gewebspezifischen RNA-Präparationen wiederholt werden.

IV.3.2 RpoTp kann durch RpoTmp ersetzt werden

An der Transkription plastidärer Gene sind in Arabidopsis mindestens drei RNA-Polymerasen beteiligt. Die plastidenkodierte RNA-Polymerase PEP erkennt Promotoren des Eubakterientyps, welche stromaufwärts von Genen lokalisiert sind, die Komponenten des Photosyntheseapparates kodieren. Des Weiteren befinden sich PEP-Promotoren oft zusammen mit NEP-Promotoren stromaufwärts von Haushaltsgenen (s. Kap. IV.2). Die kernkodierte NEP-Transkriptionsaktivität ist für die Expression fast aller Haushaltsgene, aber vor allem für die Transkription der Gene für die Untereinheiten der PEP (*rpoA*, *rpoB*-Operon) notwendig (Übersicht in Liere und Börner, 2007). Obwohl die meisten bisher beschriebenen NEP-Promotoren ein YRTA-Konsensusmotiv (Typ-I NEP-Promotoren) besitzen (Abb. 40b), gibt es einige Ausnahmen. In Arabidopsis sind es der Promotor *PclpP-58* (Typ-II NEP-Promotor; Abb. 40b) und der Pc-Promotor *Prrn16-139* (Abb. 40c), die dieses Motiv nicht besitzen. Die Analyse der *in vitro*-Transkription hat gezeigt, dass für eine genaue Erkennung der meisten Promotoren durch die zwei kernkodierten Phagentyp-RNA-Polymerasen, RpoTp und RpoTmp, *in vivo* zusätzliche, bisher unbekannte Faktoren notwendig sind (Kühn et al., 2007; Liere und Maliga, 1999).

Die spezifischen Rollen der beiden kernkodierten, plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen bei der Transkription plastidärer Gene waren bisher unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die individuellen Rollen von RpoTp und RpoTmp in der Promotorerkennung genauer zu untersuchen und aufzuklären. Die Überexpression der RpoTp im transgenen Tabak lieferte bereits zuvor einen Hinweis auf ihre Rolle bei der Transkription von Typ-I NEP-Promotoren (Liere et al., 2004). In dieser Arbeit ist es

gelungen zu zeigen, dass eine andere Phagentyp-RNA-Polymerase als RpoTp an der Transkription plastidärer Gene durch die spezifische Promotorerkennung beteiligt ist (s. Modell Abb. 44). Da für die RpoTm bisher ausschließlich eine mitochondriale Lokalisation gezeigt wurde, scheint RpoTmp, die zweite Phagentyp-RNA-Polymerase in Plastiden, der beste Kandidat zur Bewerksstellung der beobachteten Transkriptionsinitiation zu sein.

Um die individuelle Rolle der RpoTp in der Transkription plastidärer Gene zu untersuchen, wurden *RpoTp*-überexprimierende Arabidopsis-Pflanzen (Tp1x), Arabidopsis-Mutanten ohne RpoTp-Aktivität (*sca3-2*, *sca3-3*: *rpoTp*; Hricová *et al.*, 2006) sowie Arabidopsis-Pflanzen mit partiell gehemmter Genexpression von *RpoTp* (Tp5x) analysiert. Obwohl die Tp1x-Überexpressoren erhöhte Transkriptmengen von *RpoTp* zeigen, unterscheiden sie sich nicht phänotypisch vom Wildtyp (Abb. 34). Durch die schnelle Degradation der *RpoTp*-Transkripte in Tp1x scheinen diese Pflanzen keine deutlich erhöhte Menge und Aktivität von RpoTp im Vergleich zum Wildtyp zu haben. Die Analyse der *RpoT*-Genprodukte auf Proteinebene war bisher nicht durchführbar. Um die Akkumulation und Lokalisation der *RpoT*-Proteine zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Börner jeweils zwei Peptidantikörper gegen alle drei Phagentyp-RNA-Polymerasen von Arabidopsis hergestellt. Die Reaktivität der Antikörper war derzeit noch zu unterschiedlich, um verlässliche Aussagen über die Proteinakkumulation zu treffen. Sobald einwandfreie Antikörper verfügbar sind, sollte die Analyse der Proteinakkumulation der *RpoT*-Genprodukte in Pflanzen mit veränderter Expression von *RpoTp* unbedingt durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu Tp1x-Pflanzen zeigen die *rpoTp*-Pflanzen einen hellgrünen Phänotyp in ihrer Entwicklung (Abb. 37), während Tp5x-Pflanzen mit reduzierten Transkriptmengen von *RpoTp* Keimlinge mit weißen Keimblättern bilden. Diese ergrünen spätestens am neunten Entwicklungstag und entwickeln sich normal weiter (Abb. 34). Für die *RpoTp*-Insertionsmutanten *rpoTp* (*sca3-2* und *sca3-3*) wurde kürzlich die fehlende Funktionalität der RpoTp gezeigt (Hricová *et al.*, 2006).

Die Analyse der Transkript-5'-Enden von NEP- und PEP-Promotoren in vier Tage alten Keimlingen zeigt Ähnlichkeiten in der Nutzung von NEP-Promotoren zwischen den Tp5x- und den *rpoTp*-Mutanten, jedoch keine Ähnlichkeiten in der Nutzung von PEP-Promotoren. Die reduzierten Transkriptmengen von *RpoTp* scheinen zu verringerten Proteinmengen von RpoTp zu führen, was einen negativen Effekt auf die Transkription des *rpoB*-Operons zu haben scheint. Daraus resultiert möglicherweise die Abnahme der Proteinmengen der PEP, was in der Konsequenz zu einer verzögerten Akkumulation PEP-getriebener Transkripte

führt. Nach neun Tagen scheinen die Proteinmengen von RpoTp ausreichend zu sein, um eine hinreichende Expression PEP-transkribierter Photosynthesegene, wie z. B. *psbA*, zu gewährleisten und damit das Ergrünen der Keimlinge zu ermöglichen. In den *rpoTp*-Pflanzen ist die Akkumulation der am Typ-I NEP-Promotor *PrpoB*-300 generierten Transkripte nicht so stark negativ betroffen, wie in den *Tp5x*-Pflanzen. Die Transkriptmengen der am PEP-Promotor *PpsbA*-77 initiierten RNA-5'-Enden scheinen nicht betroffen zu sein (Abb. 38). Im Gegensatz zu partiell gehemmten *Tp5x*-Pflanzen fehlt den *rpoTp*-Pflanzen die RpoTp. Aus diesem Grund muss die Expression plastidärer Gene in Wechselwirkung mit dem Zellkern durch andere Kontrollmechanismen bewerkstelligt werden. Diese können z. B. eine stärkere Expression der RpoTmp, der zweiten Phagentyp-RNA-Polymerase in Plastiden, die Bereitstellung von Transkriptionsfaktoren, welche für eine spezifische Promotorerkennung sorgen oder eine Steigerung der Transkriptstabilität PEP-generierter Transkripte plastidärer Gene sein.

Die Akkumulation der RNA-5'-Enden von NEP-Promotoren unterscheidet sich auffallend in vier Tage alten *rpoTp*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 38 und Abb. 39). Während in *rpoTp*-Keimlingen die Transkript-5'-Enden einiger Typ-I NEP-Promotoren, wie *PrpoB*-300 und *Pycf1*-104 in reduzierten Mengen vorliegen, kann für *PatpB*-318 und *Pycf1*-39 keine Akkumulation beobachtet werden. Alle an diesen Promotoren generierten Transkripte akkumulieren in drei Wochen alten *rpoTp*-Pflanzen auf Wildtyp-Niveau. Mit der RpoTmp, der zweiten Phagentyp-RNA-Polymerase in Plastiden, gibt es eine weitere RNA-Polymerase, welche die Transkription von Typ-I NEP-Promotoren übernehmen und den Verlust der Aktivität der RpoTp kompensieren kann.

Während der Arbeiten zur Aufklärung der individuellen Rollen der RpoTp und RpoTmp bei der plastidären Transkription hat auch eine französische Arbeitsgruppe Untersuchungen an der *rpoTp* Mutante von *Arabidopsis* durchgeführt. Diese bestätigen die spezifische Rolle der RpoTp an der Transkription von Typ-I NEP-Promotoren während der Keimlingsentwicklung (Courtois et al., 2007). Dabei hat Courtois et al. (2007) zusätzlich zum Typ-I NEP-Promotor *PrpoB*-300 einen weiteren Transkriptionsstartpunkt von *rpoB* an der Position -538 in *sca3* Mutanten identifiziert, welcher in dieser Arbeit auch mittels der sensitiven 5'-*RACE* Analyse nicht detektiert werden konnte. Des Weiteren hat Courtois et al. (2007) die Rolle der RpoTmp bei der Transkription des sog. *non-consensus* Pc-Promotors *Prrn16*-139, jedoch nicht des Typ-II-NEP-Promotors *PclpP*-58 während der frühen Keimlingsentwicklung bestätigt. Daraus schlussfolgerten die Autoren eine

spezifische Funktion der RpoTmp lediglich bei der Transkription des *rrn*-Operons, jedoch nicht bei der Transkription von den sog. *non-consensus* Promotoren.

Die T7-RNA-Polymerase besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette und benötigt keine Transkriptionsfaktoren für eine optimale Transkription (Cheetham undSteitz, 2000). Für mitochondriale Phagentyp-RNA-Polymerasen von Tieren und der Hefe *S. cerevisiae* hingegen wurden zwei für die Promotorerkennung und Transkriptionseffizienz notwendige Transkriptionsfaktoren, mtTFB1 und mtTFB2, beschrieben (Cotney undShadel, 2006). Obwohl solche grundsätzlichen Transkriptionsfaktoren in Pflanzen bisher nicht bekannt sind, haben *in vitro*-Transkriptionsstudien mit Arabidopsis Phagentyp-RNA-Polymerasen (Kühn et al., 2007) ihre Existenz vorhergesagt. Die Daten dieser Arbeit weisen auf die Existenz weiterer promotorspezifischer Faktoren hin, die nur in bestimmten Entwicklungsstadien aktiv sind (Abb. 38 und Abb. 39). Die unterschiedliche Erkennung von NEP-Promotoren in Mutanten und im Wildtyp, insbesondere die Unfähigkeit *PatpB-318* und *Pycf1-39* in jungen Keimlingen der *rpoTp* Mutanten zu transkribieren, zeigen die fehlenden Wechselwirkungen zwischen Aktivator(en) und RpoTmp.

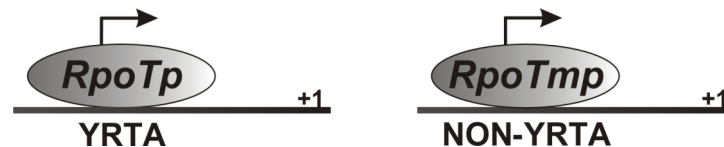


Abb. 44: Model der Arbeitsteilung zwischen den beiden plastidenlokalisierten Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp im Wildtyp von Arabidopsis. Während die RpoTp an der Transkription von Typ-I NEP-Promotoren mit dem YRTA-Konsensusmotiv beteiligt ist (links), transkribiert die RpoTmp plastidäre Gene von den sog. *non-consensus* Promotoren, die kein YRTA-Motiv beinhalten (rechts). +1 Translationsstartpunkt.

Interessanterweise ist die Akkumulation der RNA-5'-Enden von dem sog. *non-consensus* Typ-II-NEP-Promotor *PclpP-58* und dem Pc-Promotor *Prrn16-139* in vier Tage alten *rpoTp*-Keimlingen nicht betroffen, sondern eher erhöht. Das führt zu der Annahme, dass die RpoTmp eine spezielle Funktion in der Transkription von diesen Promotortypen im Wildtyp übernimmt. Die RpoTp, dagegen, scheint für die Erkennung und Transkription der Typ-I NEP-Promotoren wichtig zu sein, wie es bereits durch Liere *et al.* (2004) vermutet wurde. Neben der Aufgabenteilung zwischen der RpoTp und RpoTmp hinsichtlich der Promotornutzung (Abb. 44), finden die beiden Polymerasen unterschiedlichen Einsatz in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen Umwelteinflüssen (Emanuel et al, 2005; Abb. 43; vergl. auch Kap. III.2.1.1 bis III.2.1.3). Die Tatsache, dass die RpoTmp nicht nur

für die Transkription der sog. *non-consensus* Promotoren verantwortlich ist, sondern auch die Rolle der RpoTp bei der Transkription der Typ-I NEP-Promotoren übernehmen kann (s. Kap. III.2.3; Courtois et al., 2007), führt zu der Frage, ob vielleicht die RpoTp auch in der Lage ist, die RpoTmp zu ersetzen. Die Analyse von Arabidopsis-Mutanten *rpoT;2* mit fehlender RpoTmp-Aktivität hat eine Verminderung in der lichtinduzierten Akkumulation einiger plastidärer NEP-Transkripte, z.B. *rpoB*, gezeigt (Baba et al., 2004). Dabei ist in der *rpoT;2*-Mutante die Akkumulation der Transkripte von *clpP* und *rrn16* eher verstärkt im Vergleich zum Wildtyp. Die Analyse einer weiteren *rpoTmp*-Mutante von Arabidopsis hat keine Unterschiede in der Akkumulation der von dem sog. *non-consensus* Typ-II NEP-Promotor *PclpP*-58 und dem Pc-Promotor *Prrn16*-139 gebildeten RNA-5'-Enden gezeigt (Courtois et al., 2007). Diese Beobachtung zusammen mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte ein Hinweis darauf sein, dass, ähnlich wie die RpoTmp die RpoTp ersetzen kann, umgekehrt auch die RpoTp die Rolle der RpoTmp bei der Transkription der sog. *non-consensus* Promotoren in gewissem Umfang übernehmen kann.

Diese Überschneidung in der Funktion der beiden Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoTp und RpoTmp aber auch ihre spezifischen Rollen und Aktivität bei der Transkription plastidärer Gene in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien sind eine Herausforderung für weitere künftige Experimente.

V Literatur

- Adams, Keith L.; Daley, Daniel O.; Qiu, Yin-Long; Whelan, James und Palmer, Jeffrey D. (2000): Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants, *Nature* (Band 408), Nr. 6810, S. 354-357. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35042567>
http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6810/supinfo/408354a0_S1.html.
- Aguettaz, Pierre; Seyer, Patrick; Pesey, Hélène und Lescure, Anne-Marie (1987): Relations between the plastid gene dosage and the levels of 16S rRNA and *rbcL* gene transcripts during amyloplast to chloroplast change in mixotrophic spinach cell suspensions, *Plant Mol Biol* (Band 8), Nr. 2, S. 169-177. URL: <http://springerlink.metapress.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/BF00025328>
- Ahlert, Daniela; Ruf, Stephanie und Bock, Ralph (2003): Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco, *PNAS* (Band 100), Nr. 26, S. 15730-15735. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/100/26/15730>
- Ahmad, M.; Jarillo, J. A. und Cashmore, A. R. (1998): Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability, *Plant Cell* (Band 10), Nr. 2, S. 197-207. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/full/10/2/197>.
- Ahmad, Margaret; Jarillo, Jose A.; Smirnova, Olga und Cashmore, Anthony R. (1998): The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro, *Mol Cell* (Band 1), Nr. 7, S. 939-948 URL: <http://www.cell.com/molecular-cell/retrieve/pii/S1097276500800945>.
- Allen, J. F. (1993): Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes, *J Theor Biol* (Band 165), Nr. 4, S. 609-631. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8114509
- Allison, L. A. (2000): The role of sigma factors in plastid transcription, *Biochimie* (Band 82), Nr. 6-7, S. 537-548. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20405535>.
- Allison, L. A. und Maliga, P. (1995): Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter, *Embo J* (Band 14), Nr. 15, S. 3721-3730. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=7641691>.
- Allison, L. A.; Simon, L. D. und Maliga, P. (1996): Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants, *Embo J* (Band 15), Nr. 11, S. 2802-2809. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=450217&blobtype=pdf>.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* (Band 25), Nr. 17, S. 3389-3402. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/25/17/3389>
- Altschul, Stephen F.; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene W. und Lipman, David J. (1990): Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* (Band 215), Nr. 3, S. 403-410. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WK7-4N0J174-8/2/37c69feb1cd9b63368705c2f5f099c5b>

- Arabidopsis*-Genome-Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* (Band 408), Nr. 6814, S. 796-815. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35048692>
http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/supinfo/408796a0_S1.html.
- Argaman, L.; Hershberg, R.; Vogel, J.; Bejerano, G.; Wagner, E.G.; Margalit, H. und Altuvia, S. (2001): Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*, *Curr Biol* (Band 11), Nr. 12, S. 941-950. URL: <http://www.cell.com/current-biology/retrieve/pii/S0960982201002706>.
- Asano, T.; Yoshioka, Y.; Kurei, S.; Sakamoto, W. und Machida, Y. (2004): A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in *Arabidopsis*, *Plant J* (Band 38), Nr. 3, S. 448-459. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15086805.
- Azevedo, Jacinthe; Courtois, Florence und Lerbs-Mache, Silva (2006): Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts, *Nucleic Acids Res* (Band 34), Nr. 2, S. 436-444. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/2/436>
- Baba, K.; Nakano, T.; Yamagishi, K. und Yoshida, S. (2001): Involvement of a nuclear-encoded basic helix-loop-helix protein in transcription of the light-responsive promoter of *psbD*, *Plant Physiol* (Band 125), Nr. 2, S. 595-603. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11161017
- Baba, Kyoko; Schmidt, Julien; Espinosa-Ruiz, Ana; Villarejo, Arsenio; Shiina, Takashi; Gardestrom, Per; Sane, Aniruddha P. und Bhalerao, Rishikesh P. (2004): Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *RpoT;2* mutant of *Arabidopsis*, *Plant J* (Band 38), Nr. 1, S. 38-48. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.1365-3113X.2004.02022.x/abs>.
- Baeza, L.; Bertrand, A.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1991): Characterization of a protein binding sequence in the promoter region of the 16S rRNA gene of the spinach chloroplast genome, *Nucleic Acids Res* (Band 19), Nr. 13, S. 3577-3581. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/19/13/3577>.
- Baginsky, S. und Link, G. (2005). Redox regulation of chloroplast gene expression. In Demmig-Adams, B.; Adams, W.I. und Mattoo, A. K. (Hrsg.), *In Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment* (S. 269–287). Dordrecht: Springer, The Netherlands.
- Barkan, A. (1989): Tissue-dependent plastid RNA splicing in maize: transcripts from four plastid genes are predominantly unspliced in leaf meristems and roots, *Plant Cell* (Band 1), Nr. 4, S. 437-445. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/1/4/437>.
- Barow, M. und Meister, A. (2003): Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size, *Plant Cell and Environment* (Band 26), Nr. 4, S. 571-584.
- Bauer, Jorg; Hiltbrunner, Andreas; Weibel, Petra; Vidi, Pierre-Alexandre; Alvarez-Huerta, Mayte; Smith, Matthew D.; Schnell, Danny J. und Kessler, Felix (2002): Essential role of the G-domain in targeting of the protein import receptor atToc159 to the chloroplast outer membrane, *J Cell Biol* (Band 159), Nr. 5, S. 845-854. URL: <http://www.jcb.org/cgi/content/abstract/159/5/845>.
- Baumgartner, B. J; Rapp, J. C und Mullet, J. E. (1993): Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley

- (*Hordeum vulgare*) chloroplast development: evidence for selective stabilization of *psbA* mRNA, *Plant Physiol* (Band 101), Nr. 3, S. 781-791. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/101/3/781>.
- Baumgartner, Brian J.; Rapp, Jeffrey C. und Mullet, John E. (1989): Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development, *Plant Physiol* (Band 89), Nr. 3, S. 1011-1018. URL: <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=1055959>.
- Bedbrook, John R.; Link, Gerhard; Coen, Donald M.; Bogorad, Lawrence und Rich, Alexander (1978): Maize plastid gene expressed during photoregulated development, *PNAS* (Band 75), Nr. 7, S. 3060-3064. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/75/7/3060>.
- Bensing, B. A.; Meyer, B. J. und Dunny, G. M. (1996): Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*, *PNAS* (Band 93), Nr. 15, S. 7794-7799. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8755555.
- Berg, S.; Krause, K. und Krupinska, K. (2004): The *rbcL* genes of two *Cuscuta* species, *C. gronovii* and *C. subinclusa*, are transcribed by the nuclear-encoded plastid RNA polymerase (NEP), *Planta* (Band 219), Nr. 3, S. 541-546. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15085431.
- Binder, S. und Brennicke, A. (2003): Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (Band 358), Nr. 1429, S. 181-188; discussion 188-189. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12594926.
- Binder, S.; Marchfelder, A. und Brennicke, A. (1996): Regulation of gene expression in plant mitochondria, *Plant Mol Biol* (Band 32), Nr. 1-2, S. 303-314. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=97134924>.
- Bisanz-Seyer, Cordelia; Li, You-Fang; Seyer, Patrick und Mache, R (1989): The components of the plastid ribosome are not accumulated synchronously during the early development of spinach plants, *Plant Mol Biol* (Band 12), Nr. 2, S. 201-211. URL: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/BF00020505>.
- Bligny, M.; Courtois, F.; Thaminy, S.; Chang, C. C.; Lagrange, T.; Baruah-Wolff, J.; Stern, D. und Lerbs-Mache, S. (2000): Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases, *Embo J* (Band 19), Nr. 8, S. 1851-60. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20237621>.
- Boldt, Ralf; Börner, Thomas und Schnarrenberger, Claus (1992): Repression of the plastidic isoenzymes of aldolase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase in the barley mutant "albostrans", *Plant Physiol* (Band 99), Nr. 3, S. 895-900. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/99/3/895>.
- Börner, Thomas und Hess, Wolfgang R. (1993). Altered nuclear, mitochondrial and plastid gene expression in white barley cells containing ribosome-deficient plastids. In Kück, U. und Brennicke, A. (Hrsg.), *In Plant Mitochondria* (S. 207-220). Weinheim: Verlag Chemie.
- Bown, J.; Barne, K.; Minchin, S. und Busby, S. (1997): Extended -10 promoters, *Nucleic Acids Mol Biol* (Band 11), S. 41-52.

- Boyer, S. K. und Mullet, J. E. (1988): Sequence and transcript map of barley chloroplast *psbA* gene, *Nucleic Acids Res* (Band 16), Nr. 16, S. 8184.
- Bradbeer, J. W. und Börner, T. (1978). Activities of glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (NADP+) and phosphoribulokinase in two barley mutants deficient in chloroplast ribosomes. In *Chloroplast Development*. G. Akoyunoglou, J. H. Argyrondi-Akoyunoglou (S. 727–732). Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Bradley, D. und Gatenby, A. A. (1985): Mutational analysis of the maize chloroplast ATPase-beta subunit gene promoter: the isolation of promoter mutants in *E. coli* and their characterization in a chloroplast *in vitro* transcription system, *Embo J* (Band 4), Nr. 13B, S. 3641-3648. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/86136006>.
- Breslauer, K.J.; Frank, R.; Blocker, H. und Marky, L.A. (1986): Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *PNAS* (Band 83), Nr. 11, S. 3746-3750.
- Briat, J.F.; Laulhere, J.P. und Mache, R. (1979): Transcription activity of a DNA-protein complex isolated from spinach plastids, *Eur J Biochem* (Band 98), Nr. 1, S. 285-292. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/79236385>.
- Brown, E. C.; Somanchi, A. und Mayfield, S. P. (2001): Interorganellar crosstalk: new perspectives on signaling from the chloroplast to the nucleus, *Genome Biology* (Band 2), Nr. 8, S. Reviews 1021.1-1021.4.
- Bünger, W. und Feierabend, J. (1980): Capacity for RNA synthesis in 70S ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves, *Planta* (Band 149), Nr. 2, S. 163-169.
- Burkard, G.; Vaultier, J. P. und Weil, J. H. (1972): Differences in the level of plastid-specific tRNAs in chloroplasts and etioplasts of *Phaseolus vulgaris*, *Phytochem* (Band 11), S. 1351-1353.
- Burton, Zachary; Burgess, Richard R.; Lin, Judy; Moore, David; Holder, Sarah und Gross, Carol A. (1981): The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E. coli* K12, *Nucleic Acids Res* (Band 9), Nr. 12, S. 2889-2903. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/9/12/2889>.
- Cahoon, A. Bruce; Harris, Faith M. und Stern, David B. (2004): Analysis of developing maize plastids reveals two mRNA stability classes correlating with RNA polymerase type, *Embo R* (Band 5), Nr. 8, S. 801–806. URL: [doi:10.1038/sj.embor.7400202](https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400202).
- Carter, Andrew P.; Clemons, William M.; Brodersen, Ditlev E.; Morgan-Warren, Robert J.; Wimberly, Brian T. und Ramakrishnan, V. (2000): Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature* (Band 407), Nr. 6802, S. 340-348. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35030019>
http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6802/supinfo/407340a0_S1.html.
- Casal, Jorge J.; Frankhauser, C.; Coupland, G. und Blázquez, M. A. (2004): Signaling for developmental plasticity, *Trends Plant Sci* (Band 9), Nr. 6, S. 309-314.
- Casal, Jorge J. und Yanovsky, Marcelo J. (2005): Regulation of gene expression by light, *Int J Dev Biol* (Band 49), Nr. 4-5, S. 501-511.
- Cashmore, A. R.; Jarillo, J. A.; Wu, Y.-J. und Liu, D. (1999): Cryptochromes: Blue light receptors for plant and animals, *Science* (Band 284), Nr. 5415, S. 760-765.
- Cermakian, N.; Ikeda, T. M.; Miramontes, P.; Lang, B. F.; Gray, M. W. und Cedergren, R. (1997): On the evolution of the single-subunit RNA polymerases, *J Mol Evol* (Band 45), Nr. 6, S. 671-81. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98080640>.
- Cermakian, N.; Ikeda, T.M.; Cedergren, R. und Gray, M.W. (1996): Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage, *Nucleic Acids Res* (Band 24), Nr. 4, S. 648-654. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/96177564>.

- Chang, Ching-Chun; Sheen, Jen; Bligny, Muriel; Niwa, Yasuo; Lerbs-Mache, Silva und Stern, David B. (1999): Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases, *Plant Cell* (Band 11), Nr. 5, S. 911-926.
- Cheetham, Graham M. T. und Steitz, Thomas A. (2000): Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases, *Curr Opin Struct Biol* (Band 10), Nr. 1, S. 117-123. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VS6-3YS8JMW-M/2/f4bc3a803ef81a57c445284b20818341>
- Chen, B. ; Kubelik, A. R. ; Mohr, S. und Breitenberger, C. A. (1996): Cloning and characterization of the *Neurospora crassa* Cyt-5 gene - a nuclear-coded mitochondrial, RNA polymerase with a polyglutamine repeat, *JBC* (Band 271), Nr. 11, S. 6537-6544.
- Cheng, Y. S.; Lin, C. H. und Chen, L. J. (1997): Transcription and processing of the gene for spinach chloroplast threonine tRNA in a homologous *in vitro* system, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 233), Nr. 2, S. 380-385.
- Christopher, D. A. und Mullet, J. E. (1994): Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts, *Plant Physiol* (Band 104), Nr. 4, S. 1119-1129. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/104/4/1119>.
- Chun, L.; Kawakami, A. und Christopher, D. A. (2001): Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves, *Plant Physiol* (Band 125), Nr. 4, S. 1957-1966. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11299375
- Cookson, P. J.; Kiano, J. W.; Shipton, C. A.; Fraser, P. D.; Romer, S.; Schuch, W.; Bramley, P. M. und Pyke, K. A. (2003): Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high pigment-1 mutant of tomato, *Planta* (Band 217), Nr. 6, S. 896-903.
- Copenhaver, Gregory P. und Pikaard, Craig S. (1996): Two-dimensional RFLP analyses reveal megabase-sized clusters of rRNA gene variants in *Arabidopsis thaliana*, suggesting local spreading of variants as the mode for gene homogenization during concerted evolution, *Plant J* (Band 9), Nr. 2, S. 273-282. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-313X.1996.09020273.x>.
- Corpet, Florence (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucleic Acids Res* (Band 16), Nr. 22, S. 10881-10890. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/16/22/10881>
- Cotney, Justin und Shadel, Gerald, S. (2006): Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2, *J Mol Evol* (Band V63), Nr. 5, S. 707-717. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-006-0075-1>
- Courtois, Florence; Merendino, Livia; Demarsy, Emilie; Mache, Regis und Lerbs-Mache, Silva (2007): Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis*, *Plant Physiol* (Band 145), Nr. 3, S. 712-721. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/145/3/712>.
- De-Santis Maclossek, G.; Kofer, W.; Bock, A.; Schoch, S.; Maier, R. M.; Wanner, G.; Rudiger, W.; Koop, Hans-Ulrich und Herrmann, R. G. (1999): Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *Cl*: Molecular biology, biochemistry and ultrastructure, *Plant J* (Band 18), Nr. 5, S. 477-489. URL:

- <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119095764/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.
- Delp, G. und Kössel, H. (1991). rRNAs and rRNA genes of plastids. In I. K. Vasil, L. Bogorad (Hrsg.), *In Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. The Molecular Biology of Plastids* (S. 139-167). San Diego: Academic Press.
- Delwiche, C. F.; Kuhsel, M. und Palmer, J. D. (1995): Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids, *Mol Phylogenet Evol* (Band 4), Nr. 2, S. 110-128. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WNH-45R889V-Y&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=040cad74f148413a8d8cf62ce08eb75f.
- Demarsy, Emilie; Courtois, Florence; Azevedo, Jacinthe; Buhot, Laurence und Lerbs-Mache, Silva (2006): Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development, *Plant Physiol* (Band 142), Nr. 3, S. 993-1003. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/142/3/993>
- Deng, X. W. und Gruissem, W. (1987): Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation, *Cell* (Band 49), Nr. May 8, S. 379-387.
- Deng, X. W.; Stern, D. B.; Tonkyn, J. C. und Gruissem, W. (1987): Plastid run-on transcription. Application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes, *JBC* (Band 262), Nr. 20, S. 9641-9648. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/262/20/9641>.
- Deng, Xing Wang und Gruissem, Wilhelm (1988): Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants, *Embo J* (Band 7), Nr. 11, S. 3301-3308. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16453858>.
- Deno, H. und Sugiura, M. (1984): Chloroplast tRNA Gly gene contains a long intron in the D stem: Nucleotide sequences of tobacco chloroplast genes for tRNA Gly (UCC) and tRNA Arg (UCU), *PNAS* (Band 81), Nr. 2, S. 405-408.
- Drescher, Anja; Ruf, Stephanie; Calsa, Tercilio; Carrer, Helaine und Bock, Ralph (2000): The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes, *Plant J* (Band 22), Nr. 2, S. 97-104. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-3113x.2000.00722.x/abs>.
- DuBell, A. N. und Mullet, J. E. (1995): Differential transcription of pea chloroplast genes during light-induced leaf development, *Plant Physiol* (Band 109), Nr. 1, S. 105-112.
- Eisermann, A.; Tiller, K. und Link, G. (1990): *In vitro* transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the *psbA* promoter, *Embo J* (Band 9), Nr. 12, S. 3981-3987.
- Ellis, R. J. und Hartley, M. R. (1971): Sites of synthesis of chloroplast proteins, *Nature* (Band 233), Nr. 5320, S. 193-196. In eng\.
- Elorza, Alvaro; Leon, Gabriel; Gomez, Isabel; Mouras, Armand; Holuigue, Loreto; Araya, Alejandro und Jordana, Xavier (2004): Nuclear SDH2-1 and SDH2-2 genes, encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II in *Arabidopsis*, have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities, *Plant Physiol* (Band 136), Nr. 4, S. 4072-4087. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/136/4/4072>.

- Emanuel, Carola; von Groll, Uritza; Müller, Margarete; Börner, Thomas und Weihe, Andreas (2005): Development- and tissue-specific expression of the *RpoT* gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases, *Planta* (Band 223), Nr. 5, S. 998-1009. URL: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s00425-005-0159-y>
- Emanuel, Carola; Weihe, Andreas; Graner, A.; Hess, W. R. und Börner, T. (2004): Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves, *Plant J* (Band 38), Nr. 3, S. 460-472. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j.0960-7412.2004.02060.x>.
- Emes, M. J. und England, S. (1986): Purification of plastids from higher-plant root, *Planta* (Band 168), Nr. 2, S. 161-166.
- Ernst, D. und Aarts, M. (2004). *Cis* elements and transcription factors regulating gene promoters in response to environmental stress. In Sanderman, H. (Hrsg.), *In Molecular Ecotoxicology of Plants. Ecological studies* (S. 151-176). Berlin: Springer-Verlag.
- Falk, J.; Schmidt, A. und Krupinska, K. (1993): Characterization of plastid DNA transcription in ribosome deficient plastids of heat-bleached barley leaves, *J Plant Physiol* (Band 141), Nr. 2, S. 176-181.
- Fey, J. und Maréchal-Drouard, L. (1999): Compilation and analysis of plant mitochondrial promoter sequences: an illustration of a divergent evolution between monocot and dicot mitochondria, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 256), Nr. 2, S. 409-414. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=99180516>.
- Fey, Vidal; Wagner, Raik; Brautigam, Katharina; Wirtz, Markus; Hell, Rudiger; Dietzmann, Angela; Leister, Dario; Oelmüller, Ralf und Pfannschmidt, Thomas (2005): Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*, *JBC* (Band 280), Nr. 7, S. 5318-5328. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/280/7/5318> pii.
- Folta, Kevin M. und Spalding, Edgar P. (2001): Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition, *Plant J* (Band 26), Nr. 5, S. 471-478. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01038.x>.
- Forsberg, J.; Rosenquist, M.; Frayse, L. und Allen, J. F. (2001): Redox signalling in chloroplasts and mitochondria: genomic and biochemical evidence for two-component regulatory systems in bioenergetic organelles, *Biochem Soc Trans* (Band 29), Nr. Pt 4, S. 403-407. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11497997
- Franklin, K. A. und Whitelam, G. C. (2004): Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues, *J Exp Bot* (Band 55), Nr. 395, S. 271-276. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14673030.
- Galli, G.; Hofstetter, H. und Birnstil, M. L. (1981): Two conserved blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements., *Nature* (Band 294), Nr. 5842, S. 626-631.
- Galling, G.; Salzmann, C. und Spiess, E. (1973): Synthese von Chlorophyll und Strukturelementen des Plastiden in *Chlorella* ohne Beteiligung der Chloroplasten-Ribosomen, *Planta* (Band 114), Nr. 3, S. 269-284.
- Gamble, P.E. und Mullet, J. E. (1989): Blue light regulates the accumulation of two *psbD-psbC* transcripts in barley chloroplasts, *Embo J* (Band 8), Nr. 10, S. 2785-2794.

- Gamble, P.E.; Sexton, T. B. und Mullet, J. E. (1987): Light-dependent changes in *psbD* and *psbC* transcripts of barley chloroplasts: accumulation of two transcripts maintains *psbD* and *psbC* translation capability in mature chloroplasts, *Embo J* (Band 7), Nr. 5, S. 1289-1297.
- Gatenby, A.A.; Castleton, J.A. und Saul, M.W. (1981): Expression in *E. coli* of maize and wheat chloroplast genes for large subunit of ribulose biphosphate carboxylase, *Nature* (Band 291), Nr. 5811, S. 117-121. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/81197622>.
- Geiduschek, E.P.; Bardeleben, C.; Joazeiro, C.A.; Kassavetis, G.A. und Whitehall, S. (1995): Yeast RNA polymerase III: transcription complexes and RNA synthesis, *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research* (Band 28), Nr. 2, S. 147-159. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/96059265>.
- Giegé, P.; Hoffmann, M.; Binder, S. und Brennicke, A. (2000): RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria, *Embo R* (Band 1), Nr. 2, S. 164-170. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11265757.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998): Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells, *Int Rev Cytol* (Band 177), S. 115-180. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98025868>.
- Gray, J. C.; Sullivan, J. A.; Wang, J. H.; Jerome, C. A. und MacLean, D. (2003): Coordination of plastid and nuclear gene expression, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (Band 358), Nr. 1429, S. 135-144; discussion 144-145. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12594922
- Gray, M. W. (1992): The endosymbiont hypothesis revisited, *Int Rev Cyt* (Band 141), S. 233-357.
- Gray, M.W. (1993): Origin and evolution of organelle genomes, *Curr Opin Genet Dev* (Band 3), Nr. 6, S. 884-90. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/94162898>.
- Green, Gaynor A.; Marechal, Laurence; Weil, Jacques-Henry und Guillemaut, Pierre (1987): A *Phaseolus vulgaris* mitochondrial tRNA^{Leu} is identical to its cytoplasmic counterpart: sequencing and *in vivo* transcription of the gene corresponding to the cytoplasmic tRNA^{Leu}, *Plant Mol Biol* (Band 10), Nr. 1, S. 13-19. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00014182>.
- Gruissem, W.; Elsner-Menzel, C.; Latshaw, S.; Narita, J. O.; Schaffer, M. A. und Zurawski, G. (1986): A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream promoter elements for transcription, *Nucleic Acids Res* (Band 14), Nr. 19, S. 7541-7556.
- Gruissem, W. und Tonkyn, J. C. (1993): Control mechanisms of plastid gene expression, *Critical Reviews in Plant Sciences* (Band 12), Nr. 1-2, S. 19-55.
- Gruissem, W. und Zurawski, G. (1985): Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcL*, *atpB* and *psbA* genes, *Embo J* (Band 4), Nr. 13A, S. 3375-3383. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=554673&blobtype=pdf>.
- Hagemann, R. und Börner, T. (1978). Plastid ribosome-deficient mutants of higher plants as a tool in studying chloroplast biogenesis. In Akoyunoglou, G. und Argyrondi-Akoyunoglou, J. H. (Hrsg.), *In Chloroplast Development* (S. 709-720). Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Hager, M.; Biehler, K.; Illerhaus, J.; Ruf, S. und Bock, R. (1999): Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and

- essential subunit of the cytochrome b(6)f complex, *Embo J* (Band 18), Nr. 21, S. 5834-5842. In eng.
- Hajdukiewicz, P. T. J. ; Allison, L. A. und Maliga, P. (1997): The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids, *Embo J* (Band 16), Nr. 13, S. 4041-4048.
- Haley, J. und Bogorad, L. (1990): Alternative promoters are used for genes within maize chloroplast polycistronic transcription units, *Plant Cell* (Band 2), Nr. 4, S. 323-333. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/2/4/323>.
- Hallick, R. B.; Lipper, C.; Richards, O. C. und Rutter, W. J. (1976): Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*, *Biochemistry* (Band 15), Nr. 14, S. 3039-3045.
- Han, C. D.; Jr, E. H. Coe und Martienssen, R. A. (1992): Molecular cloning and characterization of *iojap* (ij) a pattern striping gene of maize, *Embo J* (Band 11), Nr. 11, S. 4037-4046.
- Hanaoka, M.; Kanamaru, K.; Fujiwara, M.; Takahashi, H. und Tanaka, K. (2005): Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis, *Embo R* (Band 6), Nr. 6, S. 545-550. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15877080
- Hanley-Bowdoin, L.; Orozco, E.M. Jr und Chua, N.H. (1985): *In vitro* synthesis and processing of a maize chloroplast transcript encoded by the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene, *Mol Cell Biol* (Band 5), Nr. 10, S. 2733-2745. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/86284635>.
- Hashimoto, Haruki und Possingham, J. V. (1989): Division and DNA distribution in ribosome-deficient plastids of the barley mutant "albostrians", *Protoplasma* (Band 149), Nr. 1, S. 20-23. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01623978>.
- Hayes, Robert; Kudla, Jörg und Gruissem, Wilhelm (1999): Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation, *Trends in Biochem Sci* (Band 24), Nr. 12, S. 199-202.
- Hedtke, B.; Börner, T. und Weihe, A. (1997): Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*, *Science* (Band 277), Nr. 5327, S. 809-811. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9242608.
- Hedtke, B.; Börner, T. und Weihe, A. (2000): One RNA polymerase serving two genomes, *Embo R* (Band 1), Nr. 5, S. 435-440.
- Hedtke, B.; Wagner, I.; Börner, T. und Hess, W.R. (1999): Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels, *Plant J* (Band 19), Nr. 6, S. 635-643. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20040034>.
- Hedtke, Boris; Legen, Julia; Weihe, Andreas; Herrmann, Reinhold G. und Börner, Thomas (2002): Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*, *Plant J* (Band 30), Nr. 6, S. 625-637.
- Hedtke, Boris; Meixner, Martin; Gillandt, Sabine; Richter, Ekkehard; Börner, Thomas und Weihe, Andreas (1999): Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*, *Plant J* (Band 17), Nr. 5, S. 557-561.
- Heins, L. und Soll, J. (1998): Chloroplast biogenesis: Mixing the prokaryotic and the eukaryotic?, *Curr Biol* (Band 8), Nr. 6, S. R215-R217.
- Hellmund, D.; Metzlaff, M. und Serfling, E. (1984): A transfer RNA^{Arg} gene of *Pelargonium* chloroplasts, but not a 5S RNA gene, is efficiently transcribed after injection into *Xenopus* oocyte nuclei, *Nucleic Acids Res* (Band 12), Nr. 21, S. 8253-

8268. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6209611
- Herrmann, R. G.; Westhoff, P. und Link, G. (1992). Biogenesis of plastids in higher plants. In Herrmann, R. G. (Hrsg.), *In Cell Organelles* (S. 276-349). Wien-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
- Herrmann, Reinhold G. und Feierabend, Jürgen (1980): The presence of DNA in ribosome-deficient plastids of heat-bleached rye leaves, *Eur J Biochem* (Band 104), Nr. 2, S. 603-609. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04464.x>.
- Hess, W. R. und Börner, T. (1999): Organellar RNA polymerases of higher plants, *Int Rev Cyt* (Band 190), S. 1-59.
- Hess, W. R.; Hübschmann, T. und Börner, T. (1993): Ribosome-deficient plastids of *albostrians* barley: extreme representatives of non-photosynthetic plastids, *Endocytobiosis Cell Res* (Band 10), S. 65-80.
- Hess, W. R.; Prombona, A.; Fieder, B.; Subramanian, A. R. und Börner, T. (1993): Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase, *Embo J* (Band 12), Nr. 2, S. 563-571.
- Hess, W. R.; Schendel, R.; Börner, T. und Rüdiger, W. (1991): Reduction of mRNA level for two nuclear encoded light regulated genes in the barley mutant *albostrians* is not correlated with phytochrome content and activity, *J Plant Physiol* (Band 138), S. 292-298.
- Hess, Wolfgang R.; Müller, Antje; Nagy, F. und Börner, T. (1994): Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal, *Mol Gen Genet* (Band 242), Nr. 3, S. 305-312. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00280420>.
- Hess, Wolfgang R.; Schendel, Rudolf; Rüdiger, Wolfhart; Fieder, Birte und Börner, Thomas (1992): Components of chlorophyll biosynthesis in a barley albina mutant unable to synthesize δ -aminolevulinic acid by utilizing the transfer RNA for glutamic acid, *Planta* (Band 188), Nr. 1, S. 19-27. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00198935>.
- Hiratsuka, Junzou; Shimada, Hiroaki; Whittier, Robert; Ishibashi, Takashi; Sakamoto, Masahiro; Mori, Masao; Kondo, Chihiro; Honji, Yasuko; Sun, Chong-Rong; Meng, Bing-Yuan; Li, Yu-Qing; Kanno, Akira; Nishizawa, Yoko; Hirai, Atsushi; Shinozaki, Kazuo und Sugiura, Masahiro (1989): The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals, *Mol Gen Genet* (Band 217), Nr. 2-3, S. 185-194. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/89364698>.
- Hoffer, P. H. und Christopher, D. A. (1997): Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast *psbD* promoter from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol* (Band 115), Nr. 1, S. 213-222. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97451778>.
- Howe, C. J. (1996): RNA polymerases and plastid evolution, *Trends Plant Sci* (Band 1), Nr. 10, S. 323-324.
- Howe, C. J. und Smith, Alisong. (1991): Plants without chlorophyll, *Nature* (Band 349), Nr. 6305, S. 109.
- Hricová, Andrea; Quesada, Victor und Micol, Jose Luis (2006): The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*, *Plant Physiol* (Band

- 141), Nr. 3, S. 942-956. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/141/3/942>
- Hübschmann, T. und Börner, T. (1998): Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids, *Plant Mol Biol* (Band 36), Nr. 3, S. 493-496. URL: <http://www.springerlink.com/content/1561n176x08343pt/fulltext.pdf>.
- Hughes, Jonathan E.; Neuhaus, Heike und Link, Gerhard (1987): Transcript levels of two adjacent chloroplast genes during mustard (*Sinapis alba* L.) seedling development are under differential temporal and light control, *Plant Mol Biol* (Band 9), Nr. 4, S. 355-363. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00014910>.
- Igloi, G. L. und Kössel, H. (1992): The transcriptional apparatus of chloroplasts, *Crit Rev Plant Sci* (Band 10), Nr. 6, S. 525-558.
- Ikeda, T. M. und Gray, M. W. (1999): Identification and characterization of T7/T3 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat, *Plant Mol Biol* (Band 40), Nr. 4, S. 567-578.
- Inada, H. ; Seki, M. ; Morikawa, H. ; Nishimura, M. und Iba, K. (1997): Existence of three regulatory regions each containing a highly conserved motif in the promoter of plastid-encoded RNA polymerase gene (*rpoB*), *Plant J* (Band 11), Nr. 4, S. 883-890. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3113X.1997.11040883.x>.
- Iqbal, Javed und Hudson, Alan P. (1996): An *in vitro* transcription assay for yeast mitochondria using organellar lysates, *Analytical Biochemistry* (Band 243), Nr. 2, S. 270-276.
- Iratni, R. ; Diederich, L. ; Harrak, H. ; Bligny, M. und Lerbs-Mache, S. (1997): Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids, *JBC* (Band 272), Nr. 21, S. 13676-13682.
- Iratni, R.; Baeza, L.; Andreeva, A.; Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1994): Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression., *Genes and Development* (Band 8), Nr. 23, S. 2928-2938.
- Ishihama, A. (2000): Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase, *Annu Rev Microbiol* (Band 54), S. 499-518. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11018136
- Isono, K.; Niwa, Y.; Satoh, K. und Kobayashi, H. (1997): Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots, *Plant Physiol* (Band 114), Nr. 2, S. 623-630. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/114/2/623>.
- Isono, K.; Shimizu, M.; Yoshimoto, K.; Niwa, Y.; Satoh, K.; Yokota, A. und Kobayashi, H. (1997): Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*, *PNAS* (Band 94), Nr. 26, S. 14948-14953. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98070858>.
- Jahn, D. (1992): Expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast tRNA(Glu) gene in a homologous *in vitro* transcription system is independent of upstream promoter elements, *Archives Of Biochemistry And Biophysics* (Band 298), Nr. 2, S. 505-513. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/93037487>.
- Jahn, D.; Verkamp, E. und Söll, D. (1992): Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis, *Trends Biochem Sci* (Band 17), Nr. 6, S. 215-218.
- Jansen, Robert K.; Raubeson, Linda A.; Boore, Jeffrey L.; dePamphilis, Claude W.; Chumley, Timothy W.; Haberle, Rosemarie C.; Wyman, Stacia K.; Alverson, Andrew J.; Peery, Rhiannon; Herman, Sallie J.; Fourcade, H. Matthew; Kuehl,

- Jennifer V.; McNeal, Joel R.; Leebens-Mack, James und Cui, Liying (2005): Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences, *Methods in Enzymology* (Band 395), S. 348-384.
- Jefferson, R. A. ; Kavanagh, T. A. und Bevan, M. W. (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *Embo J* (Band 6), Nr. 13, S. 3901-3907.
- Jiao, Shunxing; Thornsberry, Jeffry M.; Elthon, Thomas E. und Newton, Kathleen J. (2005): Biochemical and molecular characterization of photosystem I deficiency in the NCS6 mitochondrial mutant of maize, *Plant Mol Biol* (Band 57), Nr. 2, S. 303-313. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-004-7792-x>.
- Jukes, T. H. und Osawa, S. (1990): The genetic code in mitochondria and chloroplasts, *Cell Mol Life Sci* (Band 46), Nr. 11, S. 1117-1126. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01936921>.
- Kabeya, Y. und Sato, N. (2005): Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss *Physcomitrella patens*, *Plant Physiol* (Band 138), Nr. 1, S. 369-382. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15834007
- Kabeya, Yukihiro; Kobayashi, Yuki; Suzuki, Hiromichi; Itoh, Jun und Sugita, Mamoru (2007): Transcription of plastid genes is modulated by two nuclear-encoded α subunits of plastid RNA polymerase in the moss *Physcomitrella patens*, *Plant J* (Band 52), Nr. 4, S. 730-741. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.03270.x>.
- Kanamaru, K.; Nagashima, A.; Fujiwara, M.; Shimada, H.; Shirano, Y.; Nakabayashi, K.; Shibata, D.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (2001): An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts, *Plant Cell Physiol* (Band 42), Nr. 10, S. 1034-1043. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11673617
- Kanamaru, K. und Tanaka, K. (2004): Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants, *Biosci Biotech Biochem* (Band 68), Nr. 11, S. 2215-2223. In eng. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15564657
- Kanamaru, Kengo; Fujiwara, Makoto; Seki, Motoaki; Katagiri, Takeshi; Nakamura, Masanobu; Mochizuki, Nobuyoshi; Nagatani, Akira; Shinozaki, Kazuo; Tanaka, Kan und Takahashi, Hideo (1999): Plastidic RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol* (Band 40), Nr. 8, S. 832-842.
- Kanno, A. und Hirai, A. (1993): A transcription map of the chloroplast genome from rice (*Oryza sativa*) *Curr Genet* (Band 23), Nr. 2, S. 166-174.
- Kapoor, S. und Sugiura, M. (1999): Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus Type II *PatpB*-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells, *Plant Cell* (Band 11), Nr. 9, S. 1799-1810.
- Kapoor, S.; Suzuki, J. Y. und Sugiura, M. (1997): Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters, *Plant J* (Band 11), Nr. 2, S. 327-337.
- Kapoor, S.; Wakasugi, T.; Deno, H. und Sugiura, M. (1994): An *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA, *Curr Genet* (Band 26), Nr. 3, S. 263-268.

- Kasahara, M.; Swartz, T. E.; Olney, M. A.; Onodera, A.; Mochizuki, N.; Fukuzawa, H.; Asamizu, E.; Tabata, S.; Kanegae, H.; Takano, M.; Christie, J. M.; Nagatani, A. und Briggs, W. R. (2002): Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol* (Band 129), Nr. 2, S. 762-773.
- Kato, Yusuke; Miura, Eiko; Matsushima, Ryo und Sakamoto, Wataru (2007): White leaf sectors in yellow *variegated2* are formed by viable cells with undifferentiated plastids, *Plant Physiol* (Band 144), Nr. 2, S. 952-960. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/144/2/952>
- Kelly, J. L.; Greenleaf, A. L. und Lehman, I. R. (1986): Isolation of the nuclear gene encoding a subunit of the yeast mitochondrial RNA polymerase, *JBC* (Band 261), Nr. 22, S. 10348-10351. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/261/22/10348>.
- Kim, M.; Christopher, D. A. und Mullet, J. E. (1993): Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development, *Plant Mol Biol* (Band 22), Nr. 3, S. 447-463.
- Kim, M. und Mullet, J. E. (1995): Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter, *Plant Cell* (Band 7), Nr. 9, S. 1445-1457.
- Kim, M.; Thum, K. E.; Morishige, D. T. und Mullet, J. E. (1999): Detailed architecture of the barley chloroplast *psbD-psbC* blue light-responsive promoter, *JBC* (Band 274), Nr. 8, S. 4684-4692. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99143125>.
- Klein, R. R.; Mason, H. S. und Mullet, J. E. (1988): Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings, *J Cell Biol* (Band 106), Nr. 2, S. 289-301. URL: <http://jcb.rupress.org/cgi/content/abstract/106/2/289>.
- Klein, R. R. und Mullet, J. E. (1987): Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of *psbA*, *psaA-psaB*, and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings, *JBC* (Band 262), Nr. 9, S. 4341-4348. URL: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/262/9/4341>.
- Klein, R. R. und Mullet, J. E. (1990): Light-induced transcription of chloroplast genes. *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley, *JBC* (Band 265), Nr. 4, S. 1895-1902. URL: <http://www.jbc.org/cgi/reprint/265/4/1895>.
- Klein, R.R und Mullet, J. E. (1986): Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis, *JBC* (Band 261), Nr. 24, S. 11138-11145.
- Kobayashi, Y.; Dokiya, Y. und Sugita, M. (2001): Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts, *Biochem Biophys Res* (Band 289), Nr. 5, S. 1106-1113.
- Kössel, H.; Natt, E.; Strittmatter, G.; Fritzsche, E.; Gozdicka-Jozefiak, A. und Przybyl, D. (1985). Structure and expression of rRNA operons from plastids of higher plants. In Van Vloten-Doting, L., Groot, G., Hall, T. (Hrsg.), *In Molecular Form and Function of the Plant Genome* (S. 183–198). New York, NY: Plenum Press.
- Kozuka, Toshiaki; Horiguchi, Gorou; Kim, Gyung-Tae; Ohgishi, Maki; Sakai, Tatsuya und Tsukaya, Hirokazu (2005): The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar, *Plant Cell Physiol* (Band 46), Nr. 1, S. 213-223. URL: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/46/1/213>
- Krause, K.; Berg, S. und Krupinska, K. (2003): Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the *rrn16* PEP-promoter and of the *rpoA* and

- rpoB* genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase, *Planta* (Band 216), Nr. 5, S. 815-823. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12624769
- Krause, K.; Maier, R. M.; Kofer, W.; Krupinska, K. und Herrmann, R. G. (2000): Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome, *Mol Gen Genet* (Band 263), Nr. 6, S. 1022-1030.
- Kreps, Joel A.; Wu, Yajun; Chang, Hur-Song; Zhu, Tong; Wang, Xun und Harper, Jeff F. (2002): Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress, *Plant Physiol* (Band 130), Nr. 4, S. 2129-2141. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/130/4/2129>.
- Krupinska, K. (1992): Transcriptional control of plastid gene expression during development of primary foliage leaves of barley grown under a daily light-dark regime, *Planta* (Band 186), Nr. 2, S. 294-303.
- Krupinska, K. und Falk, J. (1994): Changes in RNA-polymerase activity during biogenesis, maturation and senescence of barley chloroplasts. comparative analysis of transcripts synthesized either in run-on assays or by transcriptionally active chromosomes, *J Plant Physiol* (Band 143), Nr. 3, S. 298-305.
- Kühn, Kristina; Bohne, Alexandra-Viola; Liere, Karsten; Weihe, Andreas und Börner, Thomas (2007): *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes, *Plant Cell* (Band 19), Nr. 3, S. 959-971. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/19/3/959>
- Kühn, Kristina; Weihe, Andreas und Börner, Thomas (2005): Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*, *Nucleic Acids Res* (Band 33), Nr. 1, S. 337-346. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/33/1/337>
- Kulaeva, O. N.; Karavaiko, N. N.; Selivankina, S. Yu.; Kusnetsov, V. V.; Zemlyachenko, Ya, V.; Cherepneva, G. N.; Maslova, G. G.; Lukevich, T. V.; Smith, A. R. und Hall, M. A. (2000): Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcription regulation, *Plant Growth Regulation* (Band 32), Nr. 2, S. 329-335. URL: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010783212459>
- Kusumi, K.; Yara, A.; Mitsui, N.; Tozawa, Y. und Iba, K. (2004): Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*, *Plant Cell Physiol* (Band 45), Nr. 9, S. 1194-1201. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15509842
- Lahiri, S. D. und Allison, L. A. (2000): Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize, *Plant Physiol* (Band 123), Nr. 3, S. 883-894.
- Lang, B. F.; Burger, G.; Kelly, C. J. O.; Cedergren, R.; Golding, G. B.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; Turmel, M. und Gray, M. W. (1997): An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature, *Nature* (Band 387), Nr. 29 May, S. 493-497.
- Legen, Julia; Kemp, Sabine; Krause, Kirsten; Profanter, Birgit; Herrmann, Reinhold G. und Maier, Rainer M. (2002): Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries, *Plant J* (Band 31), Nr. 2, S. 171-188. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-313X.2002.01349.x/abs>.
- Legen, Julia; Wanner, Gerhard; Herrmann, Reinhold G.; Small, Ian und Schmitz-Linneweber, Christian (2007): Plastid tRNA Genes *trnC*-GCA and *trnN*-GUU are

- essential for plant cell development, *Plant J* (Band 51), Nr. 5, S. 751-762. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03177.x>.
- Leister, D. (2005): Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*, *Gene* (Band 354), S. 110-116. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15908143.
- Lerbs-Mache, S. (1993): The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes?, *PNAS* (Band 90), Nr. 12, S. 5509-5513.
- Li, X. Q.; Zhang, M. und Brown, G. G. (1996): Cell-specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings, *Plant Cell* (Band 8), Nr. 11, S. 1961-1975. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/8/11/1961>.
- Liere, K.; Kestermann, M.; Müller, U. und Link, G. (1995): Identification and characterization of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast DNA region containing the genes *psbA*, *trnH* and *rps19'*, *Curr Genet* (Band 28), Nr. 2, S. 128-130.
- Liere, K. und Link, G. (1994): Structure and expression characteristics of the chloroplast DNA region containing the split gene for tRNA(Gly) (UCC) from mustard (*Sinapis alba* L.), *Curr Genet* (Band 26), Nr. 5-6, S. 557-563.
- Liere, K. und Link, G. (1995): RNA-binding activity of the *matK* protein encoded by the chloroplast *trnK* intron from mustard (*Sinapis alba* L.), *Nucleic Acids Res* (Band 23), Nr. 6, S. 917-921.
- Liere, K. und Maliga, P. (1999): *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters, *Embo J* (Band 18), Nr. 1, S. 249-257. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99094909>.
- Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007). Transcription and transcriptional regulation in plastids. In Bock, Ralph (Hrsg.), *In Topics in Current Genetics: Cell and Molecular Biology of Plastids* (S. 121-174). Berlin/Heidelberg: Springer.
- Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007). Transcription of plastid genes. In Grasser, K. D. (Hrsg.), *In Regulation of Transcription in Plants* (S. 184-224). Oxford: Blackwell Publishing. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470988886.ch8>.
- Liere, Karsten; Kaden, Daniela; Maliga, Pal und Börner, Thomas (2004): Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type, *Nucleic Acids Res* (Band 32), Nr. 3, S. 1159-1165. URL: <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/abstract/32/3/1159>.
- Liere, Karsten und Maliga, Pal (1999). Novel *in vitro* transcription assay indicates that the *accD* NEP promoter is contained in a 19 bp fragment. In Argyroudi-Akoyunoglou, J. H. und Senger, H. (Hrsg.), *In The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology* (S. 79-84). Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- Liere, Karsten und Maliga, Pal (2001). Plastid RNA Polymerases. In Andersson, Bertil und Aro, Eva-Maria (Hrsg.), *In Regulation of Photosynthesis* (S. 29-49). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Lilly, Jason W.; Maul, Jude E. und Stern, David B. (2002): The *Chlamydomonas reinhardtii* organellar genomes respond transcriptionally and post-transcriptionally to abiotic stimuli, *Plant Cell* (Band 14), Nr. 11, S. 2681-2706. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/14/11/2681>.
- Lin, Chentao; Ahmad, Margaret und Cashmore, Anthony R. (1996): *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development, *Plant J* (Band 10), Nr. 5, S. 893-902. URL: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10050893.x>.

- Lindemann, Peter; Koch, Antje; Degenhardt, Babett; Hause, Gerd; Grimm, Bernhard und Papadopoulos, Vassilios (2004): A novel *Arabidopsis thaliana* protein is a functional peripheral-type benzodiazepine receptor, *Plant Cell Physiol* (Band 45), Nr. 6, S. 723-733. URL: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/45/6/723>.
- Link, G. (1994). Plastid differentiation: organelle promoters and transcription factors. In Nover, L. (Hrsg.), *In Plant Promoters and Transcription Factors - Results & Problems in Cell Differentiation* (S. 65-85). Berlin: Springer Verlag.
- Link, G. (1996): Green life: control of chloroplast gene transcription, *BioEssays* (Band 18), Nr. 6, S. 465-471.
- Liscum, E. und Hangarter, R. P. (1993): Light-stimulated apical hook opening in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Plant Physiol* (Band 101), Nr. 2, S. 567-572. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/101/2/567>.
- Loiseaux, S. (1976): Ultrastructural modifications of plastids after action of chloramphenicol, lincomycin and rifampicin, *Physiol. vég* (Band 14), S. 1-10.
- López-Juez, E. und Pyke, K. A. (2005): Plastids unleashed: their development and their integration in plant development, *Int J Dev Biol* (Band 49), Nr. 5-6, S. 557-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16096965
- Ma, Ligeng; Li, J.; Qu, L.; Hager, J.; Chen, Z.; Zhao, Hongyu und Deng, Xing Wang (2001): Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways, *Plant Cell* (Band 13), Nr. 12, S. 2589-2607.
- Mackenzie, Sally und McIntosh, Lee (1999): Higher plant mitochondria, *Plant Cell* (Band 11), Nr. 4, S. 571-586. URL: <http://www.plantcell.org>.
- Maliga, P. (1998): Two plastid polymerases of higher plants: an evolving story, *Trends Plant Sci* (Band 3), Nr. 1, S. 4-6.
- Maréchal-Drouard, L.; Well, J. H. und Guillemaut, P. (1988): Import of several tRNAs from the cytoplasm into the mitochondria in bean *Phaseolus vulgaris*, *Nucleic Acids Research* (Band 16), Nr. 11, S. 4777-4788.
- Martin, W. (2003): Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks, *PNAS* (Band 100), Nr. 15, S. 8612-8614. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12861078.
- Martin, William und Herrmann, Reinhold G. (1998): Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why?, *Plant Physiol* (Band 118), Nr. 1, S. 9-17. URL: <http://www.plantphysiol.org>
- Más, Paloma; Devlin, Paul F.; Panda, Satchidananda und Kay, Steve A. (2000): Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2, *Nature* (Band 408), Nr. 6809, S. 207-211. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35041583>.
- Masters, B. S.; Stohl, L. L. und Clayton, D. A. (1987): Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7, *Cell* (Band 51), Nr. 1, S. 89-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3308116
- Matsuo, Mitsuhiro und Obokata, Junichi (2006): Remote control of photosynthetic genes by the mitochondrial respiratory chain, *Plant J* (Band 47), Nr. 6, S. 873-882. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02839.x>.
- Matsuzaki, M.; Misumi, O.; Shin, I. T.; Maruyama, S.; Takahara, M.; Miyagishima, S. Y.; Mori, T.; Nishida, K.; Yagisawa, F.; Nishida, K.; Yoshida, Y.; Nishimura, Y.; Nakao, S.; Kobayashi, T.; Momoyama, Y.; Higashiyama, T.; Minoda, A.; Sano, M.;

- Nomoto, H.; Oishi, K.; Hayashi, H.; Ohta, F.; Nishizaka, S.; Haga, S.; Miura, S.; Morishita, T.; Kabeya, Y.; Terasawa, K.; Suzuki, Y.; Ishii, Y.; Asakawa, S.; Takano, H.; Ohta, N.; Kuroiwa, H.; Tanaka, K.; Shimizu, N.; Sugano, S.; Sato, N.; Nozaki, H.; Ogasawara, N.; Kohara, Y. und Kuroiwa, T. (2004): Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Nature* (Band 428), Nr. 6983, S. 653-657. URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v428/n6983/full/nature02398.html>.
- Mayfield, S. P.; Yohn, C. B.; Cohen, A. und Danon, A. (1995): Regulation of chloroplast gene expression, *Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol* (Band 46), Nr. 6, S. 147-166.
- McFadden, G. I. (2001): Chloroplast origin and integration, *Plant Physiol* (Band 125), Nr. 1, S. 50-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11154294>
<http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/125/1/50>.
- Meng, B. Y.; Tanaka, M.; Wakasugi, T.; Ohme, M.; Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1988): Cotranscription of the genes encoding two P700 chlorophyll a apoproteins with the gene for ribosomal protein CS14: determination of the transcriptional initiation site by *in vitro* capping, *Curr Genet* (Band 14), Nr. 4, S. 395-400.
- Meng, B. Y.; Wakasugi, T. und Sugiura, M. (1991): Two promoters within the *psbK-psbI-trnG* gene cluster in tobacco chloroplast DNA, *Curr Genet* (Band 20), Nr. 3, S. 259-264. URL: <http://www.springerlink.com/content/p7217403h44q5181/>.
- Merrick, W. C. und Dure, L. S. (1972): The developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. IV. Levels of cytoplasmic and chloroplastic transfer ribonucleic acid species, *J Biol Chem* (Band 247), Nr. 24, S. 7988-7999.
- Mesquita, J. F. (1971): Inhibition de la morphogénèse des chloroplastes dans les racines du *Lupinus albus* L. exposées a la lumière, *Boletim da Sociedade Broteriana* (Band 45), S. 336-379.
- Miyagi, T.; Kapoor, S.; Sugita, M. und Sugiura, M. (1998): Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence, *Mol Gen Genet* (Band 257), Nr. 3, S. 299-307. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98179086>.
- Miyamura, Shinichi; Kuroiwa, Tsuneyoshi und Nagata, Toshiyuki (1990): Multiplication and differentiation of plastid nucleoids during development of chloroplasts and etioplasts from proplastids in *Triticum aestivum*, *Plant Cell Physiol* (Band 31), Nr. 5, S. 597-602. URL: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/5/597>
- Mohr, H. (1994). Coaction between pigment systems. In Kendrick R. E., Kronenberg G. H. M. (Hrsg.), *In Photomorphogenesis in Plants* (S. 353-373). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Monde, R.A.; Schuster, G. und Stern, D.B. (2000): Processing and degradation of chloroplast mRNA, *Biochimie* (Band 82), Nr. 6-7, S. 573-582. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20405538>.
- Morden, C. W.; Wolfe, K. H.; dePamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1991): Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes, *Embo J* (Band 10), Nr. 11, S. 3281-3288.
- Mullet, J. E. und Klein, R. R. (1987): Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels, *EMBO Journal* (Band 6), S. 1571-1579. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16453773>.

- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 8), Nr. 19, S. 4321-4325. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7433111
- Nagashima, A.; Hanaoka, M.; Motohashi, R.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Kanamaru, K.; Takahashi, H. und Tanaka, K. (2004): DNA microarray analysis of plastid gene expression in an *Arabidopsis* mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2, *Biosci Biotech Biochem* (Band 68), Nr. 3, S. 694-704. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15056905.
- Nagashima, A.; Hanaoka, M.; Shikanai, T.; Fujiwara, M.; Kanamaru, K.; Takahashi, H. und Tanaka, K. (2004): The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol* (Band 45), Nr. 4, S. 357-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15111710
- Nakahira, Y.; Baba, K.; Yoneda, A.; Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1998): Circadian-regulated transcription of the *psbD* light-responsive promoter in wheat chloroplasts, *Plant Physiol* (Band 118), Nr. 3, S. 1079-1088. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99026310>.
- Nakamura, Takahiro; Furuhashi, Yumiko; Hasegawa, Keiko; Hashimoto, Hiroshi; Watanabe, Kazufumi; Obokata, Junichi; Sugita, Mamoru und Sugiura, Masahiro (2003): Array-based analysis on tobacco plastid transcripts: preparation of a genomic microarray containing all genes and all intergenic regions, *Plant Cell Physiol* (Band 44), Nr. 8, S. 861-867. URL: <http://pcp.oupjournals.org/cgi/content/abstract/44/8/861>.
- Neuhaus, H. und Link, G. (1987): The chloroplast tRNA^{Lys} (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide, *Curr Genet* (Band 11), Nr. 4, S. 251-257. URL: <http://www.springerlink.com/content/w127205980u65046/>.
- Neuhaus, H. und Link, G. (1990): The chloroplast *psbK* operon from mustard (*Sinapis alba* L.): multiple transcripts during seedling development and evidence for divergent overlapping transcription, *Curr Genet* (Band 18), Nr. 4, S. 377-383.
- Neuhaus, H.; Pfannschmidt, T. und Link, G. (1990): Nucleotide sequence of the chloroplast *psbI* and *trnS*-GCU genes from mustard (*Sinapis alba* L.), *Nucleic Acids Res* (Band 18), Nr. 2, S. 368.
- Nickelsen, J. und Link, G. (1990): Nucleotide sequence of the mustard chloroplast genes *trnH* and *rps19*, *Nucleic Acids Res* (Band 18), Nr. 4, S. 1051.
- Nickelsen, J. und Link, G. (1991): RNA-protein interactions at transcript 3' ends and evidence for *trnK-psbA* cotranscription in mustard chloroplasts, *Mol Gen Genet* (Band 228), Nr. 1-2, S. 89-96.
- Oda, K.; Yamato, K.; Ohta, E.; Nakamura, Y.; Takemura, M.; Nozato, N.; Kohchi, T.; Ogura, Y.; Kanegae, T.; Akashi, K. und Ohyama, K. (1992): Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome, *J Mol Biol* (Band 223), Nr. 1, S. 1-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1731062.

- Oelmüller, Ralf (1989): Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels, *Photochem Photobiol* (Band 49), Nr. 2, S. 229-239. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1989.tb04101.x>.
- Ohme, M.; Kamogashira, T.; Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1985): Structure and cotranscription of tobacco chloroplast genes for tRNA^{Glu}(UUC), tRNA^{Tyr}(GUA) and tRNA^{Asp}(GUC), *Nucleic Acids Res* (Band 13), Nr. 4, S. 1045-1056.
- Oikawa, K.; Tanaka, K. und Takahashi, H. (1998): Two types of differentially photo-regulated nuclear genes that encode sigma factors for chloroplast RNA polymerase in the red alga *Cyanidium caldarium* strain RK-1, *Gene* (Band 210), Nr. 2, S. 277-85. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T39-3SRBHWR-1K&_user=964000&_coverDate=04%2F14%2F1998&_alid=520888662&_rdoc=1&_fmt=summary&_orig=search&_qd=1&_cdi=4941&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049508&_version=1&_urlVersion=0&_userid=964000&md5=be07b4422032ce2f765d24b11c10d07a.
- Palmer, J.D. (1991). Plastid chromosomes: structure and evolution. In L. Bogorad, I.K. Vasil (Hrsg.), *In Cell Culture and Somatic Genetics of Plant. Molecular Biology of Plastids* (S. 5-53). San Diego: Academic Press.
- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1994): Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, *Plant Mol Biol* (Band 25), Nr. 1, S. 69-81.
- Pfannschmidt, Thomas und Liere, Karsten (2005): Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression, *Antioxid Redox Signal* (Band 7), Nr. 5-6, S. 607-618. URL: <http://www.liebertonline.com/loi/ars>
- Pfannschmidt, Thomas; Nilsson, Anders und Allen, John F. (1999): Photosynthetic control of chloroplast gene expression, *Nature* (Band 397), Nr. 6720, S. 625-628.
- Pfützinger, H.; Maréchal-Drouard, L.; Pillay, D. T.; Weil, J. H. und Guillemaut, P. (1990): Variations during leaf development of the relative amounts of two bean (*Phaseolus vulgaris*) chloroplast tRNAs (Phe) which differ in their minor nucleotide content, *Plant Mol Biol* (Band 14), Nr. 6, S. 969-975.
- Pfützinger, Helene; Guillemaut, Pierre; Weil, Jacques-Henry und Pillay, D. T. N. (1987): Adjustment of the tRNA population to the codon usage in chloroplasts, *Nucl. Acids Res.* (Band 15), Nr. 4, S. 1377-1386. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/15/4/1377>.
- Possingham, J. V. und Lawrence, M. E. (1983): Controls to plastid division, *Int Rev Cytol* (Band 84), S. 1-56.
- Raghavendra, Agepati S. und Padmasree, Kollipara (2003): Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation, *Trends Plant Sci* (Band 8), Nr. 11, S. 546-553.
- Rapp, J. C.; Baumgartner, B. J. und Mullet, J. (1992): Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold, *JBC* (Band 267), Nr. 30, S. 21404-21411. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/267/30/21404>.
- Reiss, T.; Bergfeld, R.; Link, G.; Thien, W. und Mohr, H. (1983): Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for cytosolic enzyme levels and plant development, *Planta* (Band 159), Nr. 6, S. 518-528.
- Reiss, T. und Link, G. (1985): Characterization of transcriptionally active DNA-protein complexes from chloroplasts and etioplasts of mustard (*Sinapis alba* L.), *Eur J Biochem* (Band 148), Nr. 2, S. 207-212.

- Reznikov, W.; Siegle, D. A.; Cowing, D.W. und Gross, C.A. (1985): The regulation of transcription initiation in bacteria., *Annu Rev Genet* (Band 19), S. 355-387.
- Ribichich, Karina F.; Tioni, Mariana F.; Chan, Raquel L. und Gonzalez, Daniel H. (2001): Cell-type-xpecific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flowers and roots, *Plant Physiol* (Band 125), Nr. 4, S. 1603-1610. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/125/4/1603>.
- Rodermel, S. (2001): Pathways of plastid-to-nucleus signaling, *Trends Plant Sci* (Band 6), Nr. 10, S. 471-478. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11590066
- Rogalski, Marcelo; Ruf, Stephanie und Bock, Ralph (2006): Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival, *Nucleic Acids Res* (Band 34), Nr. 16, S. 4537-4545. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/34/16/4537>
- Rozen, Steve und Skaletsky, Helen J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz, S., Misener, S. (Hrsg.), *In Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (S. 365-386). Totowa, NJ: Humana Press.
- Sakai, Atsushi; Saito, Chieko; Inada, Noriko und Kuroiwa, Tsuneyoshi (1998): Transcriptional activities of the chloroplast-nuclei and proplastid-nuclei isolated from tobacco exhibit different sensitivities to tagetitoxin: implication of the presence of distinct RNA polymerases, *Plant Cell Physiol* (Band 39), Nr. 9, S. 928-934. URL: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/39/9/928>
- Salvador, M. L.; Klein, U. und Bogorad, L. (1993): Light-regulated and endogenous fluctuations of chloroplast transcript levels in *Chlamydomonas*. Regulation by transcription and RNA degradation, *Plant J* (Band 3), Nr. 2, S. 213-219.
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraste, M. (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siècle, *Science* (Band 283), Nr. 5407, S. 1488-1493.
- Sasaki, Yukiko ; Tomoda, Yoshihisa; Tomi, Hironori ; Kamikubo, Tadashi und Shinozaki, Kazuo (1985): Synthesis of ribulose biphosphate carboxylase in greening pea leaves, *Eur J Biochem* (Band 152), Nr. 1, S. 179-186. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09179.x>.
- Sato, S.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Asamizu, E. und Tabata, S. (1999): Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*, *DNA Research* (Band 6), Nr. 5, S. 283-290. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10574454
- Satoh, Junko; Baba, Kyoko; Nakahira, Yoichi; Tsunoyama, Yuichi; Shiina, Takashi und Toyoshima, Yoshinori (1999): Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat, *Plant J* (Band 18), Nr. 4, S. 407-416.
- Schlunzen, Frank; Zarivach, Raz; Harms, Jorg; Bashan, Anat; Tocilj, Ante; Albrecht, Renate; Yonath, Ada und Franceschi, Francois (2001): Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria, *Nature* (Band 413), Nr. 6858, S. 814-821. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/35101544>.
- Schmidt, Wolfgang und Schikora, Adam (2001): Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development, *Plant Physiol* (Band 125), Nr. 4, S. 2078-2084. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/125/4/2078>.

- Schön, A.; Krupp, G.; Gough, S.; Berry-Lowe, S.; Kannangara, C. G. und Söll, D. (1986): The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA, *Nature* (Band 322), Nr. 6076, S. 281-284. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3637637
- Schrubar, H.; Wanner, G. und Westhoff, P. (1990): Transcriptional control of plastid gene expression in greening *Sorghum* seedlings, *Planta* (Band 183), Nr. 1, S. 101-111.
- Schuster, Gadi; Lisitsky, Irena und Klaff, Petra (1999): Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast, *Plant Physiol* (Band 120), Nr. 4, S. 937-944. URL: <http://www.plantphysiol.org>.
- Seo, Mitsunori; Hanada, Atsushi; Kuwahara, Ayuko; Endo, Akira; Okamoto, Masanori; Yamauchi, Yukika; North, Helen; Marion-Poll, Annie; Sun, Tai-Ping; Koshiba, Tomokazu; Kamiya, Yuji; Yamaguchi, Shinjiro und Nambara, Eiji (2006): Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism, *Plant J* (Band 48), Nr. 3, S. 354-366. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118565234/abstract>.
- Sexton, T. Berends; Christopher, D. A. und Mullet, J. E. (1990): Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression, *Embo J* (Band 9), Nr. 13, S. 4485-4494. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=552241&blobtype=pdf>.
- Sexton, T. Berends; Jones, J. T. und Mullet, J. E. (1990): Sequence and transcriptional analysis of the barley ctDNA region upstream of *psbD-psbC* encoding *trnK* (UUU), *rps16*, *trnQ* (UUG), *psbK*, *psbI*, and *trnS* (GCU), *Curr Genet* (Band 17), Nr. 5, S. 445-454.
- Shadel, Gerald S. und Clayton, David A. (1993): Mitochondrial Transcription, *JBC* (Band 268), Nr. 22, S. 16083-16086.
- Shen, Yanxin; Danon, Avihai und Christopher, David A. (2001): RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner, *Plant Cell Physiol* (Band 42), Nr. 10, S. 1071-1078. URL: <http://pcp.oupjournals.org/cgi/content/abstract/42/10/1071>.
- Shiina, Takashi; Tsunoyama, Yuichi; Nakahira, Yoichi und Khan, Muhammad S. (2005): Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants, *Int Rev Cyt* (Band 244), S. 1-68. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7CTY-4H2WWR9-1/2/9ad9388c69d3c47b8d0a571f71ec8a7a>
- Shinozaki, K.; Ohme, M.; Tanaka, M.; Wakasugi, T.; Hayashida, N.; Matsabayashi, T.; Zaita, N.; Chungwongse, J.; Obokata, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Deno, H.; Kamogashira, T.; Yamada, K.; Kasuda, J.; Takaiwa, F.; Kato, A.; Todoh, N.; Shimada, H. und Sugiura, M. (1986): The complete sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression, *EMBO Journal* (Band 5), S. 2043-2049.
- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998): Mapping of the promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant, *Curr Genet* (Band 33), Nr. 5, S. 340-344. URL: <http://www.springerlink.com/content/pyfdu4and7bvr0x8/>.
- Small, I.; Maréchal-Drouard, L.; Masson, J.; Pelletier, G.; Cosset, A.; Weil, J. H. und Dietrich, A. (1992): *In vivo* import of a normal or mutagenized heterologous transfer RNA into the mitochondria of transgenic plants: towards novel ways of influencing mitochondrial gene expression?, *Embo J* (Band 11), Nr. 4, S. 1291-1296.

- Smith-Johannsen, H.; Fromson, D. und Gibbs, S. P. (1980): The effects of spectinomycin and ethidium bromide on the synthesis of organelle rRNA and on ultrastructure in *Ochromonas danica*, *J Cell Sci* (Band 43), Nr. 1, S. 119-136. URL: <http://jcs.biologists.org/cgi/content/abstract/43/1/119>.
- Smith-Johannsen, Heidi und Gibbs, Sarah P. (1972): Effects of chloramphenicol on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Ochromonas dani*, *J Cell Biol* (Band 52), Nr. 3, S. 598-614. URL: <http://www.jcb.org/cgi/content/abstract/52/3/598>.
- Sriraman, Priya; Silhavy, Daniel und Maliga, Pal (1998): The phage-type *PclpP*-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site, *Nucleic Acids Res* (Band 26), Nr. 21, S. 4874-4879.
- Sriraman, Priya; Silhavy, Daniel und Maliga, Pal (1998): Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors, *Plant Physiol* (Band 117), Nr. 4, S. 1495-1499.
- Staub, J. M. und Maliga, P. (1993): Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA, *Embo J* (Band 12), Nr. 2, S. 601-606.
- Strittmatter, G.; Gozdicka-Jozefiak, A. und Kössel, H. (1985): Identification of an rRNA operon promoter from *Zea mays* chloroplast which excludes the proximal tRNA^{Val} from the primary transcript, *Embo J* (Band 4), S. 599-604.
- Sugita, M. und Sugiura, M. (1996): Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants, *Plant Mol Biol* (Band 32), Nr. 1-2, S. 315-326.
- Sugiura, M. (1992): The chloroplast genome, *Plant Mol Biol* (Band 19), Nr. 1, S. 149-168.
- Sugiura, M. (1995): The chloroplast genome, *Essays Biochem* (Band 30), S. 49-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8822148
- Sugiura, M. und Wakasugi, T. (1989): Compilation and comparison of transfer RNA genes from tobacco chloroplasts, *Crit Rev Plant Sci* (Band 8), S. 89-101.
- Sundberg, E.; Slagter, J. G.; Fridborg, I.; Cleary, S. P.; Robinson, C. und Coupland, G. (1997): ALBIN03, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria, *Plant Cell* (Band 9), Nr. 5, S. 717-730. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/9/5/717>.
- Suzuki, Jon Y.; Sriraman, Priya; Svab, Zora und Maliga, Pal (2003): Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants, *Plant Cell* (Band 15), Nr. 1, S. 195-205. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/15/1/195>.
- Svab, Zora; Hajdukiewicz, Peter T. J. und Maliga, Pal (1990): Stable transformation of plastids in higher plants, *PNAS* (Band 87), Nr. 21, S. 8526-8530. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=11607112>.
- Swiatecka-Hagenbruch, Monika; Emanuel, Carola; Hedtke, Boris; Liere, Karsten und Börner, Thomas (2008): Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase, *Nucleic Acids Res* (Band 36), Nr. 3, S. 785-792. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/full/36/3/785>.
- Tahar, S. Ben; Bottomley, W. und Whitfeld, P. R. (1986): Characterization of the spinach chloroplast genes for the S4 ribosomal protein, tRNA^{Thr} (UGU) and tRNA^{Ser} (GGA), *Plant Mol Biol* (Band 7), Nr. 1, S. 63-70. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00020132>

- Tan, S. und Troxler, R.F. (1999): Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression, *PNAS* (Band 96), Nr. 9, S. 5316-5321. URL: <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=99238527>.
- Tepperman, J. M.; Zhu, T.; Chang, H. S.; Wang, X. und Quail, P. H. (2001): Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling, *PNAS* (Band 98), Nr. 16, S. 9437-9442. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11481498>
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/98/16/9437>
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/16/9437>.
- Thum, Karen E.; Kim, Minkyun; Christopher, David A. und Mullet, John E. (2001): Cryptochrome 1, cryptochrome 2, and phytochrome a co-activate the chloroplast *psbD* blue light-responsive promoter, *Plant Cell* (Band 13), Nr. 12, S. 2747-2760. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/13/12/2747>.
- Thum, Karen E.; Kim, Minkyun; Morishige, Daryl T.; Eibl, Christian; Koop, Hans-Ulrich und Mullet, John E. (2001): Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco, *Plant Mol Biol* (Band 47), Nr. 3, S. 353-366. URL: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011616400264>.
- Till, B.; Schmitz-Linneweber, C.; Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2001): CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin, *RNA* (Band 7), Nr. 9, S. 1227-1238. URL: <http://www.rnajournal.org/cgi/content/abstract/7/9/1227>.
- Tiranti, V. ; Savoia, A. ; Forti, F. ; Dapolito, M. F. ; Centra, M. ; Racchi, M. und Zeviani, M. (1997): Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase, *Hum Mol Genet* (Band 6), Nr. 4, S. 615-625. URL: <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/6/4/615>.
- Topping, J. F. und Leaver, C. J. (1990): Mitochondrial gene expression during wheat leaf development, *Planta* (Band 182), Nr. 3, S. 399-407.
- Tracy, R. L. und Stern, D. B. (1995): Mitochondrial transcription initiation: promoter structures and RNA polymerases, *Curr Genet* (Band 28), Nr. 3, S. 205-216.
- Tsunoyama, Y.; Morikawa, K.; Shiina, T. und Toyoshima, Y. (2002): Blue light specific and differential expression of a plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett* (Band 516), Nr. 1-3, S. 225-228. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11959137.
- Tymms, M. J.; Scott, N. S. und Possingham, J. V. (1983): DNA content of *Beta vulgaris* chloroplasts during leaf cell expansion, *Plant Physiol* (Band 71), Nr. 4, S. 785-788. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16662908
- Unsold, M.; Marienfeld, J. R.; Brandt, P. und Brennicke, A. (1997): The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides, *Nature Genetics* (Band 15), Nr. 1, S. 57-61.
- van Lis, Robert und Atteia, Ariane (2004): Control of mitochondrial function via photosynthetic redox signals, *Photosynthesis Research* (Band 79), Nr. 2, S. 133-148. URL: <http://dx.doi.org/10.1023/B:PRES.0000015409.14871.68>.
- Vera, A. und Sugiura, M. (1995): Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: an additional novel-type promoter, *Curr Genet* (Band 27), Nr. 3, S. 280-284.

- Vogel, J. ; Hübschmann, T. ; Börner, T. und Hess, W. R. (1997): Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: support for MatK as an essential splice factor, *J Mol Biol* (Band 270), Nr. 2, S. 179-187.
- Wada, T.; Tunoyama, Y.; Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1994): *In vitro* analysis of light-induced transcription in the wheat *psbD/C* gene cluster using plastid extracts from dark-grown and short-term-illuminated seedlings, *Plant Physiol* (Band 104), Nr. 4, S. 1259-1267.
- Wakasugi, T.; Sugita, M.; Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (1998): Updated gene map of tobacco chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology Reporter* (Band 116), S. 231-241.
- Wakasugi, Tatsuya; Ohme, Masaru; Shinozaki, Kazuo und Sugiura, Masahiro (1986): Structures of tobacco chloroplast genes for tRNA^{Ile} (CAU), tRNA^{Leu} (CAA), tRNA^{Cys} (GCA), tRNA^{Ser} (UGA) and tRNA^{Thr} (GGU): a compilation of tRNA genes from tobacco chloroplasts, *Plant Mol Biol* (Band 7), Nr. 5, S. 385-392. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00032568>.
- Weglöhner, Wolfgang und Subramanian, Alap R. (1991): A heptapeptide repeat contributes to the unusual length of chloroplast ribosomal protein S18 Nucleotide sequence and map position of the *rpl33-rps18* gene cluster in maize, *FEBS Lett* (Band 279), Nr. 2, S. 193-197. In eng. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T36-44M4217-HN&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=da559ec8afe99a7811cbaf1f1b129302.
- Weihe, A.; Hedtke, B. und Börner, T. (1997): Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*, *Nucleic Acids Res* (Band 25), Nr. 12, S. 2319-2325. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/97315321>.
- Weihe, Andreas (2004). The transcription of plant organelle genomes. In Daniell, Henry und Chase, Christine D. (Hrsg.), *In Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* (S. 213-237). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Weihe, Andreas und Börner, Thomas (1999): Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts, *Trends Plant Sci* (Band 4), Nr. 5, S. 169-170. URL: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD1-3WRB3CC-1C&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7962dc03e3d1bd7ae1c1af55020e5148.
- Westhoff, Peter und Herrmann, Reinhold G. (1988): Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach, *Eur J Biochem* (Band 171), Nr. 3, S. 551-564. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13824.x>.
- Wolfe, K. H.; Morden, C. W.; Ems, S. C. und Palmer, J. D. (1992): Rapid evolution of the plastid translational apparatus in a nonphotosynthetic plant: loss or accelerated sequence evolution of tRNA and ribosomal protein genes, *J Mol Evol* (Band 35), Nr. 4, S. 304-317. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404416?ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum.
- Wolfe, K. H.; Morden, C. W. und Palmer, J. D. (1992): Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant, *PNAS* (Band 89), Nr. 22, S. 10648-10652. URL:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=1332054>.
- Wu, C. Y.; Lin, C. H. und Chen, L. J. (1997): Identification of the transcription start site for the spinach chloroplast serine tRNA gene, *FEBS Lett* (Band 418), Nr. 1-2, S. 157-161. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/98074928>.
- Xie, G. und Allison, L. A. (2002): Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco *atpB* NEP promoter in chloroplasts *in vivo*, *Curr Genet* (Band 41), Nr. 3, S. 176-182. URL: <http://www.springerlink.com/content/37w70hvdkg8tlqy/>.
- Yang, D.; Oyaizu, Y.; Oyaizu, H.; Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1985): Mitochondrial origins, *PNAS* (Band 82), Nr. 13, S. 4443-4447. URL: <http://www.pnas.org/content/82/13/4443.abstract>.
- Yao, W. B.; Meng, B. Y.; Tanaka, M. und Sugiura, M. (1989): An additional promoter within the protein-coding region of the *psbD-psbC* gene cluster in tobacco chloroplast DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 17), Nr. 23, S. 9583-9591. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/17/23/9583>.
- Young, D.A.; Allen, R.L.; Harvey, A.J. und Lonsdale, D.M. (1998): Characterization of a gene encoding a single-subunit bacteriophage-type RNA polymerase from maize which is alternatively spliced, *Mol Gen Genet* (Band 260), Nr. 1, S. 30-37. URL: <http://www.biomednet.com/db/medline/99045290>.
- Zoschke, Reimo; Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007): From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development, *Plant J* (Band 50), Nr. 4, S. 710-722. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3113.2007.03084.x>
- Zubko und Day (2002): Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants, *Mol Genet Genomics* (Band 267), Nr. 1, S. 27-37. URL: http://www.springerlink.com/content/publ_gma89vptfx3a
<http://dx.doi.org/10.1007/s00438-001-0627-4>
- Zubko, Mikhajlo K. und Day, Anil (1998): Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome free plastid inheritance, *Plant J* (Band 15), Nr. 2, S. 265-271. URL: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-3113.1998.00195.x/abs>.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen:

Preuten, T., Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K. und Börner, T. (2008). Influence of light on the expression of plastidial phage-type polymerases and plastidial gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Manuskript in Vorbereitung.

Swiatecka-Hagenbruch, M., Emanuel, C., Hedtke, B., Liere, K. und Börner, T. (2008). Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **36** (3): 785-792.

Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K. und Börner, T. (2007). High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **277** (6): 725-734.

Vortrag:

Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K., Börner, T. (2006) Transcription of plastid genes: phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis* and their promoters. 11th Colloquium of the German Section of the International Society of Endocytobiology, Philipps-Universität Marburg

Konferenzbeiträge:

Swiatecka-Hagenbruch, M., Hedtke, B., Liere, K., Börner, T. (2007) Transcription of chloroplast genes. 10th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Gmunden, Österreich

Swiatecka-Hagenbruch, M., Hedtke, B., Liere, K., Börner, T. (2007) Transcription of chloroplast genes. Botanikertagung 2007, Universität Hamburg

Swiatecka-Hagenbruch, M., Hedtke, B., Liere, K., Börner, T. (2007) Transcription of chloroplast genes: phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis* and their promoters. 20th Colloquium Molecular Biology of Plants, Dabringhausen

Swiatecka-Hagenbruch, M., Hedtke, B., Liere, K., Börner, T. (2006) Transcription of chloroplast genes: phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis* and their promoters. Plant Genetics 2006, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Swiatecka-Hagenbruch, M., Hedtke, B., Liere, K., Börner, T. (2006) Transcription of chloroplast genes: phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis* and their promoters. 3rd International Symposium "Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism" of the Collaborative Research Center SFB 429 "Molecular Physiology, Energetics and Regulation of the Primary Metabolism in Plants", Universität Potsdam

Danksagung

Diese Arbeit entstand am Lehrstuhl für Genetik des Institutes für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Thomas Börner. Ihm danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Beratung und den mir zugestandenen Freiraum bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit sowie Verwirklichung eigener Ideen.

Meinem Betreuer Dr. Karsten Liere danke ich für die immer aufschlussreichen Gespräche, sein kritisches Hinterfragen meiner Arbeiten und Ideen, für seinen vielseitigen fachlichen Rat. Mein Dank gilt ihm auch für sein unermüdliches Antreiben, die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie sein fortwährendes Hilfesystem *Apple für Einsteiger*.

Meinen Labormitstreitern Alex Böhne, Stefanie Hertel, Kristina Kühn und Uwe Richter danke ich für die fachlichen Ratschläge und motivierenden Impulse, vor allem Alex für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu jeder noch so späten Stunde.

Mein besonderer Dank gebührt Conny Stock für ihren unermüdlichen Einsatz bei der einwandfreien Bewältigung der vielen *Invitros* und RNA-Isolationen sowie ihre fachliche Kompetenz und ihr Engagement bei der Lösung der unzähligen, täglich wiederkehrenden Abwegigkeiten bei der Laborarbeit und Pflanzenanzucht.

Dr. Martin Meixner und Antje Sonntag danke ich für die schnelle und unkomplizierte Abwicklung der vielen Sequenzierungen, welche zu einer der tragenden Säulen dieser Arbeit geworden sind.

Simone Hardel, Björn Richter und Maria Dams danke ich für ihre praktische Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Bei Tobias Preuten bedanke ich mich für die Durchführung der Durchflusszytometrie.

Allen Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Genetik, Molekulare Ökologie und Molekulare Genetik danke ich für die fachlichen Anregungen, zahlreichen Diskussionen und Ratschläge. Mein spezieller Dank gilt den Laboren 3 und 3,5 für die beste Laboratmosphäre sowie spannende Abenteuer außerhalb des Labors. Ihnen auch ein besonderer Dank für ihre Fürsorge und Sorge um mein leibliches Wohl. Es war eine tolle Zeit!

Ein Dankeschön gilt allen Freunden für Motivation und Geduld.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann Toralf, die mich die ganzen Studienjahre uneingeschränkt unterstützt haben und mir immer die Freiheit gelassen haben, meinen eigenen Weg zu gehen. Vor allem danke ich ihnen für sehr viel Geduld und Rücksicht während der *heißen Phase* dieser Arbeit. Gut, dass ich Euch habe!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit im Fach Biologie selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Berlin, den 30.09.2008